

TEHNICI DE BIOLOGIE MOLECULARĂ

– principii și aplicații practice

Sergiu Emil Georgescu
Andreea Dudu
Marieta Costache

editura universității din bucurești

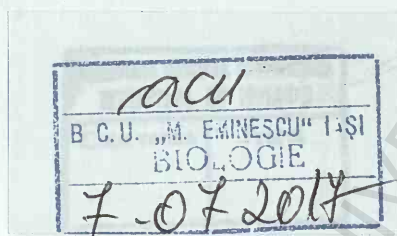
14 -12.739

Sergiu Emil Georgescu

Andreea Dudu

Marieta Costache

**Tehnici de biologie moleculară – principii
și aplicații practice**



Reproducerea integrală sau parțială, multiplicarea prin orice mijloace și sub orice formă, cum ar fi fotocopierea, scanarea, transpunerea în format electronic sau audio, punerea la dispoziția publică, inclusiv prin internet sau prin rețele de calculatoare, stocarea permanentă sau temporară pe dispozitive sau sisteme cu posibilitatea recuperării informațiilor, cu scop comercial sau gratuit, precum și alte fapte similare săvârșite fără permisiunea scrisă a deținătorului copyrightului reprezintă o încălcare a legislației cu privire la protecția proprietății intelectuale și se pedepsesc penal și/ sau civil în conformitate cu legile în vigoare.

bcu 111-12439

Sergiu Emil Georgescu
Andreea Dudu
Marieta Costache

30 lei

**Tehnici de biologie moleculară – principii
și aplicații practice**



0 000008 28496

BCU IASI



editura universității din bucurești*

2016

REFERENȚI ȘTIINȚIFICI:

Prof. dr. ANCA DINISCHIOTU

Universitatea din București

Prof. dr. ANDREEA IREN ȘERBAN

Universitatea de Științe Agronomice și Medicină Veterinară București

Prof. dr. DANIELA GRĂDINARU

Universitatea de Medicină și Farmacie "Carol Davila" București

© *editura universității din bucurești*[®]

Șos. Panduri nr. 90-92, 050663 București – ROMÂNIA

Tel./Fax: +40 214102384

E-mail: editura.unibuc@gmail.com

Internet: <http://editura-unibuc.ro>

Centru de vânzare:

Bd. Regina Elisabeta nr. 4-12,

030018 București – ROMÂNIA

Tel. +40 213053703

Tipografie:

Bd. Iuliu Maniu, Nr. 1-3,

061071, București – România

Tel. 0213152510

Redactor: ALEXANDRU DAN

Coperta și DT: LAURENȚIU MUȘOIU

Descrierea CIP a Bibliotecii Naționale a României

GEORGESCU, SERGIU EMIL

Tehnici de biologie moleculară : principii și aplicații practice / Sergiu Emil Georgescu, Andreea Dudu, Marieta Costache. - București : Editura Universității

din București, 2016

Conține bibliografie

ISBN 978-606-16-0729-7

I. Dudu, Andreea

II. Costache, Marieta

CUPRINS

CAPITOLUL I. METODE DE IZOLARE ȘI ANALIZĂ A ACIZILOR NUCLEICI	11
I.1 Introducere în structura și proprietățile acizilor nucleici	11
I.1.1 Structura primară a acizilor nucleici	11
I.1.2 Structura secundară a acizilor nucleici	15
I.1.3 Proprietățile fizico-chimice ale acizilor nucleici	18
I.2 Izolarea și purificarea acizilor nucleici	22
I.3 Determinarea spectrofotometrică a purității și concentrației acizilor nucleici	27
I.4 Ultracentrifugarea	31
I.5 Tehnici electroforetice de separare și analiză a acizilor nucleici	40
I.5.1. Electroforeza ADN în gel de poliacrilamidă (PAGE – <i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>)	44
I.5.2. Electroforeza ADN în gel de agaroză	46
I.5.3. Electroforeza ARN în gel de agaroză	47
I.5.4 Electroforeza de proteine	47
I.6 Tehnici derivate de la metodele electroforetice de separare a acizilor nucleici	48
I.6.1 SSCP (<i>Single Strand Conformation Polymorphism</i>) – Polimorfismul conformațional al monocatenelor	48
I.6.2 DGGE (<i>Denaturing Gel Gradient Electrophoresis</i>) – Electroforeza în gradient de gel denaturant	51
I.6.3 PFGE (<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i>) – Electroforeza în câmp pulsatoriu	53
CAPITOLUL II. TEHNOLOGIA ADN RECOMBINANT. CLONAREA MOLECULARĂ	57
II.1. Instrumente moleculare utilizate în obținerea ADN recombinant	57
II.1.1. Vectori de clonare	57
II.1.2. Sistemele de restricție-modificare bacteriene	63
II.2. Clonarea moleculară	70
II.2.1. Obținerea vectorilor recombinanți	70
II.2.2. Transformarea la bacterii și drojdii	73
II.2.3. Metode de detecție a vectorilor recombinanți în celule	78

CAPITOLUL III. HIBRIDIZĂRI MOLECULARE	83
III.1 Tehnica <i>Southern Blotting</i>	85
III.2 Tehnica <i>Northern Blotting</i>	88
III.3 Tehnicile <i>Dot Blotting</i> și <i>Slot Blotting</i>	90
III.4 Tehnica <i>Western Blotting (Immunoblotting)</i>	91
III.5 Tehnici de hibridizare <i>in situ</i> și imunohistochimie	94
III.5.1 Hibridizarea <i>in situ</i> (ISH - <i>In Situ</i> Hibridization)	94
III.5.2 Tehnica hibridizării fluorescente <i>in situ</i> (FISH - <i>Fluorescent In Situ</i> <i>Hibridization</i>)	97
III.6 Tehnica <i>Microarray</i>	99
III.6.1 Analiza acizilor nucleici prin tehnica <i>Microarray</i>	99
III.6.2 Analiza proteinelor prin tehnica <i>Microarray</i>	105
 CAPITOLUL IV. AMPLIFICAREA IN VITRO A SECVENȚELOR DE ACIZI NUCLEICI	 107
IV.1 Tehnica PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	107
IV.1.1 Etapele tehnicii PCR	108
IV.1.2 Componentele unei reacții PCR	110
IV.1.3 Parametri de timp și temperatură	116
IV.1.4 Probleme în realizarea reacției PCR	117
IV.2 Variante ale tehnicii PCR	118
IV.2.1 <i>Hot-Start</i> PCR	118
IV.2.2 <i>Nested</i> PCR	118
IV.2.3 PCR revers transcris (RT-PCR)	119
IV.2.4 PCR multiplex	121
IV.2.5 PCR asimetric	121
IV.2.6 <i>Touch-Down</i> PCR	122
IV.2.7 PCR invers	122
IV.2.8 PCR pentru detecția metilărilor	124
IV.3 Tehnici derivate din reacția PCR	124
IV.3.1 PCR în timp real (<i>Real-Time</i> PCR)	124
IV.3.2 Tehnica RAPD (<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>)	134
IV.3.3 Tehnica AFLP (<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>)	136
IV.3.4 Tehnica PCR-RFLP (<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)	137
IV.3.5 Tehnica RACE (<i>Rapid Amplification of cDNA Ends</i>)	138

CAPITOLUL V. SECVENȚIALIZAREA ACIZILOR NUCLEICI	141
V.1 Metoda chimică Maxam și Gilbert	141
V.2 Metoda Sanger – prima generație de secvențializare	142
V.3 Secvențializarea de nouă generație	146
V.3.1 A doua generație de secvențializare	148
V.3.2 A treia generație de secvențializare	153
 CAPITOLUL VI. APLICAȚII PRACTICE ALE TEHNICILOR DE BIOLOGIE MOLECULARĂ	 159
VI.1. Testarea paternității și identificarea individuală	159
VI.2 Tehnici de diagnostic molecular al unor maladii genetice	165
VI.2.1 Diagnosticarea maladiilor genetice prin analiza fragmentelor marcate fluorescent	166
VI.2.2 Diagnosticarea maladiilor genetice prin tehnica PCR-RFLP	169
VI.2.3 Diagnosticarea maladiilor genetice prin tehnica <i>Real-Time</i> PCR	173
VI.3 Identificarea speciilor și hibrizilor interspecifici cu ajutorul tehnicilor de biologie moleculară	176
VI.3.1 Identificarea de specie la salmonide prin PCR-RFLP	176
VI.3.2 Identificarea de specie la acipenseride prin PCR-RFLP	178
VI.3.3 Identificarea hibrizilor interspecifici cu ajutorul markerilor ADN	181
VI.4 Analiza markerilor moleculari asociați cu caracterele morfo-productive la animale de fermă	194
VI.4.1. Analiza genelor asociate cu calitatea cărnii la suine	195
VI.4.2. Analiza genelor implicate în determinismul culorii robei la cabaline	198
VI.4.3. Analiza moleculară a locilor asociați cu calitatea laptelui la bovine	201
VI.4.4. Analiza moleculară a locilor asociați cu calitatea laptelui la ovine	205
VI.4.5. Analiza genelor asociate cu prolificitatea la ovine	208
VI.5 Filogenie și filogeografie	210
VI.5.1 Analiza relațiilor filogenetice în cadrul ordinului Acipenseriformes	210
VI.5.2 Analiza filogeografică a speciilor de sturioni din regiunea Ponto-Caspică	220
VI.6 Aplicații ale utilizării ARN în criminalistică	234
 BIBLIOGRAFIE	 242

Lista abrevierilor utilizate în text

2-ME - β -mercaptoetanol
 α -La - α -lactalbumină
 α -MSH - α -*Melanocyte-Stimulating Hormone*
 β -Lg - β -lactoglobulină
ADN - acid deoxiribonucleic
ADNc - ADN complementar
ADNmt - ADN mitochondrial
AFLP - *Amplified Fragment Length Polymorphism*
APS - adenzin-5'-fosfosulfat
ARN - acid ribonucleic
ARNm - acid ribonucleic mesager
ARNr - acid ribonucleic ribozomal
ARNsn - acid ribonucleic *small nuclear*
ARNt - acid ribonucleic de transfer
ARS - *Autonomus Replicating Sequence*
ASIP - *Agouti Signaling Protein*
BAC - *Bacterial Artificial Chromosome*
BLAD - *Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency*
BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool*
BMP15 - *Bone Morphogenetic Protein 15*
BMRP1B - *Bone Morphogenetic Protein Receptor 1B*
cAMP - ciclic adenzin 5' monofosfat
CBS - *Conserved Block Sequences*
CCD - *Charge Coupled Device*
CCS - *Central Conserved Sequence*
CE-SSCP - *Capillary Electrophoresis - Single Strand Conformation Polymorphism*
CGH - *Comparative Genomic Hybridization*
ChIP - *Chromatine Immunoprecipitation*
Ct - *Threshold Cycle*
CTAB - bromură de cetil-trimetil-amoniu
ddNTP - 2'-3'dideoxiribonucleotid-trifosfat
DEPC - dietilpirocarbonat
DGGE - *Denaturing Gel Gradient Electrophoresis*
DMSO - dimetil-sufoxid
dNTP - deoxinucleotid-trifosfați
DTT - ditiotreitoli
EDTA - acid etilen-diamino-tetraacetic
ER - receptor estrogen
ESU - *Evolutionary Significant Units*
FAO - *Food and Agriculture Organization*

FCA - Factorial Correspondence Analysis
 FDD-PCR - Fluorescent Differential Display PCR
 FISH - Fluorescent In Situ Hybridization
 FISH-BOL - Fish Barcode of Life Initiative
 FITC - Fluorescein izotiocianat
 FRET - Fluorescence Resonance Energy Transfer
 GDF9 - Growth Differentiation Factor 9b
 GSU - Genetic Stocking Units
 HM - hipertermia malignă
 HYPP - Hyperkalemic Periodic Paralysis
 HMDS - hexametil-disilazan
 ISH - In Situ Hybridization
 IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry
 JEB - Junctional Epidermolysis Bullosa
 LAMC2 - Laminin subunit gamma-2
 LATE-PCR - Linear After The Exponential PCR
 LINE - Long Interspersed Nuclear Elements
 IncARN - Long Non Coding ARN
 LOH - Loss Of Heterozygosity
 MC1R - receptor pentru melanocortină
 MCMC - Markov Chain Monte Carlo
 MCS - Multiple Cloning Site
 MIAME - Minimum Information About a Microarray Experiment
 miARN - micro ARN
 MJ - Median-Joining
 ML - Maximum Likelyhood
 MP - Maximum Parcimony
 NCBI - National Center for Biotechnology Information
 NGS - Next Generation Sequencing
 NJ - Neighbor Joining
 NMP - nucleozid-5' monofosfat
 oligo-dT - oligodeoxitimidină
 PAA - Population Aggregation Analysis
 PAC - P1 Artificial Chromosome
 PAGE - Polyacrylamide Gel Electrophoresis
 pb - perechi de baze
 PCR - Polymerase Chain Reaction
 PCR-RFLP - PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism
 Pd - Power of Discrimination
 PE - Power of Exclusion
 PEG - polietilen glicol
 PFA - paraformaldehidă
 PFGE - Pulsed Field Gel Electrophoresis

pM - *Matching Probability*
PMI - *interval postmortem*
poliA - *poliadenozină*
PSE - *Pale Soft Exsudative*
PSS - *Porcine Stress Syndrom*
PVDF - *difluorură de polivinidilenă*
qPCR - *quantitative PCR*
QTL - *Quantitative Trait Loci*
RACE - *Rapid Amplification of cDNA Ends*
RAPD - *Random Amplified Polymorphic DNA*
RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism*
RIN - *RNA Integrity Number*
RT-PCR - *PCR revers transcris*
RyR1 - *Ryanodine Receptor 1*
SCID - *Severe Combined Immunodeficiency*
SDS - *sodiu dodecil sulfat*
SDS-PAGE - *Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis*
siARN - *silencing ARN*
SINE - *Short Interspersed Nuclear Elements*
SNP - *Single Nucleotide Polymorphism*
SOLiD - *Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection*
SSC - *Saline Sodium Citrate*
SSCP - *Single Strand Conformation Polymorphism*
STR - *Short Tandem Repeats*
TAS - *Termination Associated Sequence*
TEMED - *N,N,N',N'- tetrametiletilediamină*
TGF β - *Transforming Growth Factor Beta*
TGGE - *Temperature Gel Gradient Electrophoresis*
Tm - *temperatură de topire (melting)*
TRIS - *Tris(hidroximetil)aminometan*
TRITC - *Tetrametil-rodamin-izotiocianat*
UV - *ultraviolet*
WoRMS - *World Register of Marine Species*
X-gal - *5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranozid*
YAC - *Yeast Artificial Chromosome*
ZMW - *Zero-Mode Waveguide*

CAPITOLUL I

METODE DE IZOLARE ȘI ANALIZĂ A ACIZILOR NUCLEICI

I.1 Introducere în structura și proprietățile acizilor nucleici

I.1.1 Structura primară a acizilor nucleici

Descoperirea faptului că acidul deoxiribonucleic (ADN) este molecula purtătoare a informației genetice a concentrat întreaga atenție a lumii științifice pe determinarea structurii acestuia. În 1953, James Watson și Francis Crick au descoperit structura dublucatenară, complementară a moleculei de ADN. Ulterior au fost elucidate și structurile diferitelor molecule de acizi ribonucleici (ARN).

Denumirea de acizi nucleici provine din faptul că ADN a fost pentru prima dată izolat din nucleii celulelor. Ulterior s-a evidențiat existența acizilor nucleici (ADN și ARN) atât în nucleu cât și în citoplasma celulelor dar denumirea a fost păstrată din considerente istorice.

Există două tipuri de acizi nucleici:

- ADN (acid deoxiribonucleic), localizat în principal în nucleul celulelor, dacă acesta este individualizat, cum este cazul eucariotelor;
- ARN (acid ribonucleic), prezent în citoplasma celulelor, dar și în nucleu.

ADN este o moleculă esențială a celulei, informațiile conținute în structura sa fiind transmise descendenților. Acizii ribonucleici, ARNr (ARN ribozomal), ARNt (ARN de transfer) și ARNm (ARN mesager), sunt moleculele implicate în procesul de sinteză proteică.

Din punct de vedere structural, acizii nucleici sunt molecule polinucleotidice lungi formate din repetiția unor subunități numite nucleotide. Un nucleotid este format la rândul său dintr-un glucid, o bază azotată și una sau mai multe grupări fosfat.

Există două tipuri de pentoze care intră în alcătuirea nucleotidelor: riboza în cazul ARN și deoxiriboza în cazul ADN (Figura 1).

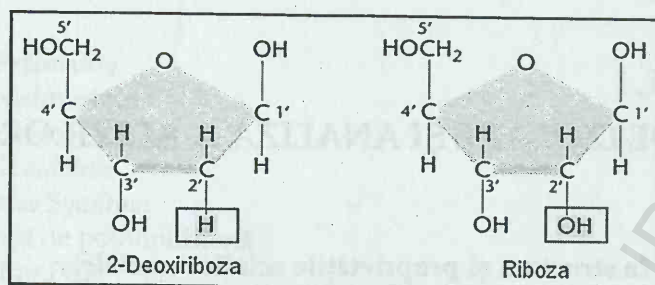


Figura 1. Pentozele din structura acizilor nucleici.

Numerotarea atomilor de carbon din structura pentozelor se face de la 1' la 5'. De asemenea, în structura nucleotidelor întâlnim și mai multe tipuri de baze azotate: purinice (adenina sau guanina) sau pirimidinice (citozina și timina în ADN, respectiv citozina și uracilul în ARN). Numerotarea atomilor de carbon și de azot din compoziția bazelor azotate se face de la 1 la 9 în cazul bazelor purinice și de la 1 la 6 în cazul celor pirimidinice (Figura 2).

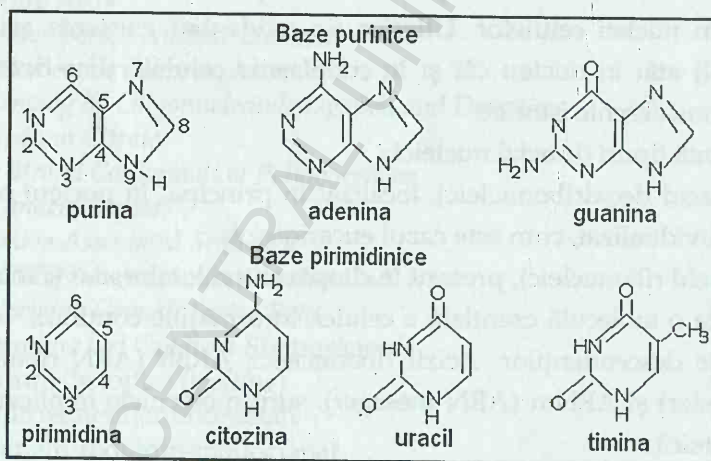


Figura 2. Bazele azotate din structura acizilor nucleici.

O bază azotată împreună cu o pentoză formează un nucleozid, iar legătura dintre cele două se numește N-glicozidică (Figura 3). Legătura N-glicozidică se stabilește întotdeauna între atomul de carbon din poziția 1' a pentozei (C-1') și atomul de azot din poziția 9 (N 9), în cazul bazelor purinice, respectiv din poziția 1 (N-1), în cazul bazelor pirimidinice.

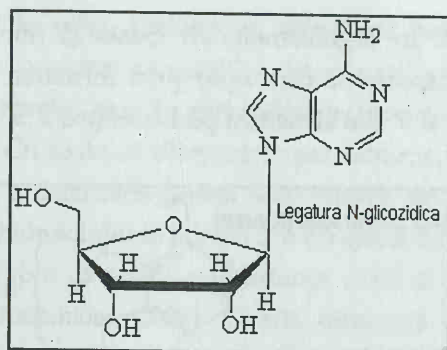


Figura 3. Legătura N-glicozidică.

Legătura glicozidică poate fi de tip α sau β în funcție de poziționarea ei față de atomul de carbon C-1', dar în nucleozide aceasta este întotdeauna în poziție β . Există 5 nucleozide standard întâlnite în acizii nucleici: adenozină, guanozină, citidină, timidină și uridină. În funcție de tipul de pentoza din structura lor, acestea pot fi ribo- sau deoxiribonucleozide.

La nivelul nucleozidelor, rotația bazei azotate în jurul legăturii N-glicozidice este liberă. Din această cauză se pot întâlni două tipuri de conformații ale acestora: *syn* și *anti*. În conformația *syn* baza azotată este situată deasupra planului pentozei, iar în conformația *anti* ea este opusă planului pentozei (Figura 4).

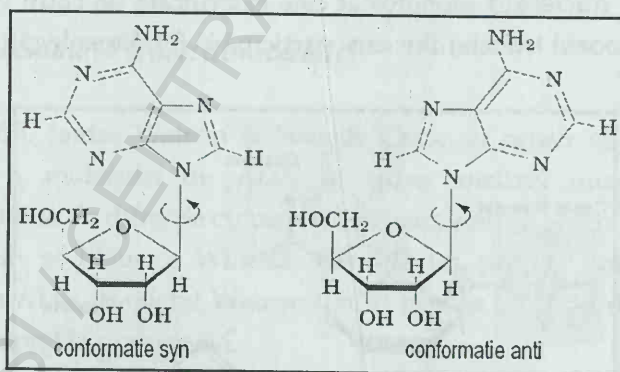


Figura 4. Conformațiile *syn* și *anti* ale nucleozidelor.

Prin legarea uneia sau mai multor grupări fosfat la un nucleozid se va obține un nucleotid. Nucleotidele pot fi mono-, di- sau trifosfat. De asemenea, legarea grupărilor fosfat se poate face la nivelul oricărei grupări hidroxil libere din compoziția pentozei. Cu toate acestea, în structura acizilor nucleici întâlnim numai nucleozid 5' monofosfați (Figura 5). În funcție de tipul pentozei există ribonucleotide

sau deoxiribonucleotide. În organismele vii există și nucleotide ciclice cu roluri metabolice extrem de importante care apar prin formarea unei punți fosfoesterice între atomii de carbon 3' și 5' din structura pentozei (ex. 3',5' AMP sau cAMP).

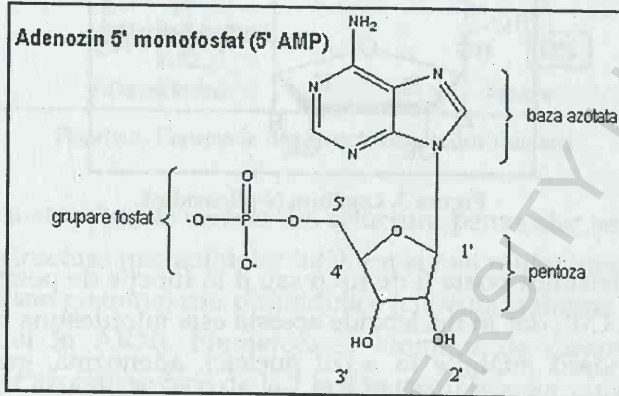


Figura 5. Structura unui nucleotid.

În structura acizilor nucleici, nucleotidele sunt înălțuite prin legături fosfodiesterice stabilite între hidroxilul din poziția 3' al unui nucleotid și gruparea fosfat din poziția 5' a nucleotidului următor (Figura 6). Indiferent de tipul de acid nucleic, reacția de asamblare a nucleotidelor este aceeași: gruparea hidroxil din poziția 3' al unui nucleozid monofosfat este esterificată de către gruparea 5' fosfat din structura nucleozid trifosfatului care participă la formarea legăturii.

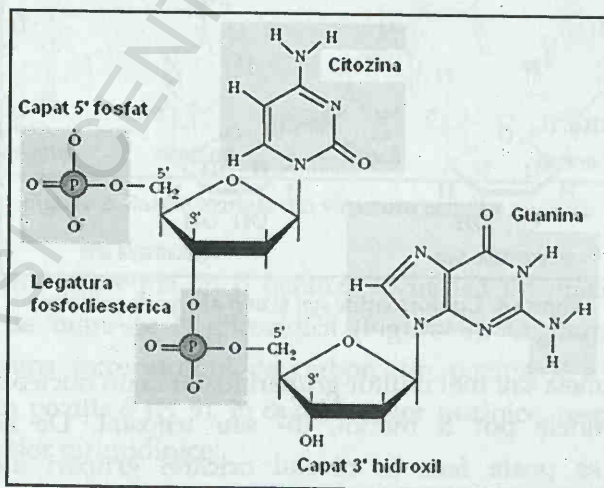


Figura 6. Legătura fosfodiesterică.

Cele două tipuri de acizi nucleici se deosebesc prin două caracteristici de structură fundamentale: prezența pentozelor diferite (riboză în ARN și deoxiriboză în ADN) și diferența la nivelul bazelor pirimidinice (timină în ADN și uracil în ARN, citozina fiind comună). Cu toate că diferențele par minime, ele au consecințe majore și sunt suficiente pentru a determina funcții total diferite ale celor două tipuri de acizi nucleici. Astfel, prezența hidroxilului în poziția 2' a ribozei determină imposibilitatea ARN de a forma structuri dublu catenare pe distanțe mari și o reactivitate crescută a acestuia (Costache și Dinischiotu, 2004). O altă diferență de compoziție constă în prezența la nivelul ARN a bazelor azotate atipice de tipul hipoxantinei întâlnită în structura inozinei.

Faptul că acizii nucleici sunt molecule compuse din înălțuirea nucleozid-5' monofosfaților (NMP) are următoarele consecințe directe (Costache și Dinischiotu, 2004):

a) catena lor prezintă orientare. Sensul convențional 5'-3' a fost adoptat pentru lectura și scrierea polinucleotidelor, dar și pentru reprezentările simbolice.

b) bazele azotate fixate regulat sunt dispuse pe un schelet covalent pentozo-fosfat (Figura 7). Scheletul acizilor nucleici (format din succesiunea pentozelor și a grupărilor fosfat) este un polianion care are o densitate totală de sarcină negativă foarte mare, fapt important în tehnicile de separare și purificare ale ADN și ARN.

1.1.2 Structura secundară a acizilor nucleici

În anul 1953, James Watson și Francis Crick au reușit să deducă structura tridimensională a moleculei de ADN în urma analizei multiplelor fotografii provenite din studiile de difracție cu raze X efectuate asupra acidului nucleic de către Rosalind Franklin și Maurice Wilkins. Cei doi au propus atunci și un model structural pentru ADN (modelul Watson-Crick) care în timp s-a dovedit a fi corect, fiind unanim acceptat la ora actuală.

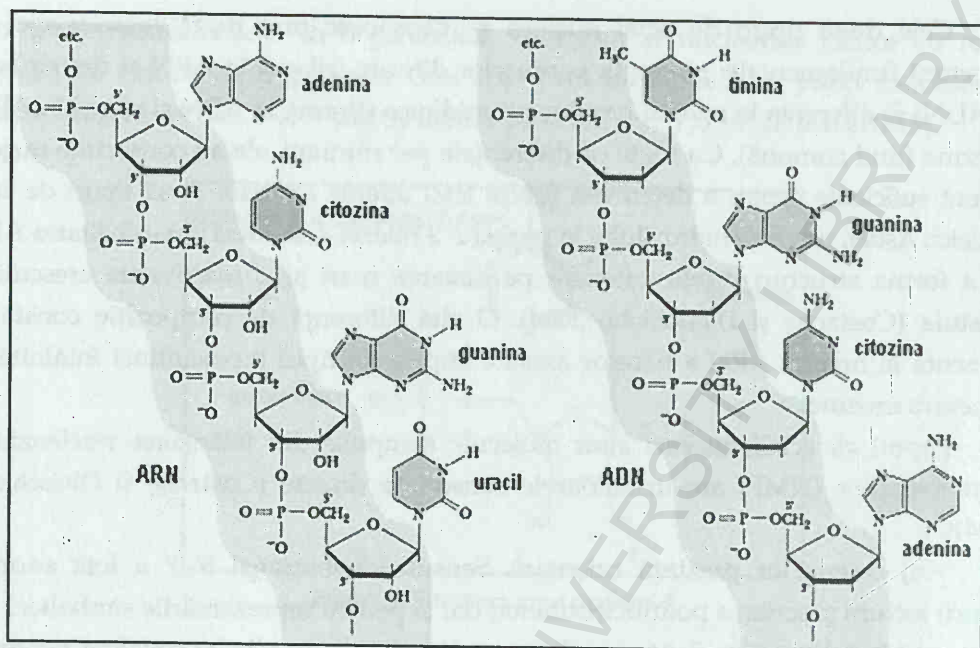


Figura 7. Structura comparativă a celor două tipuri de acizi nucleici (lanțul polinucleotidic și scheletul pentoza-fosfat - după Garrett și Grisham, Biochemistry, 2005).

Conform modelului propus de cei doi cercetători, molecula de ADN este formată din două catene polinucleotidice răsucite în formă helicoidală în jurul unui ax comun. Cele două catene sunt orientate în direcții opuse (antiparalele), una în direcție 5'-3', alta 3'-5'. Bazele azotate sunt orientate către interiorul dublului helix, iar resturile fosfat și pentoza se află la exterior. Planurile bazelor sunt perpendiculare pe axa întregii structuri helicoidale. Cele două catene sunt stabilizate și totodată menținute împreună prin punți de hidrogen stabilite exclusiv pe bază de complementaritate între adenină și timină (două legături de hidrogen), respectiv guanină și citozină (trei legături de hidrogen). Această relație între bazele azotate ale duplexului ADN se numește complementaritate. Diametrul acestei structuri de dublu helix este de 2 nm, iar pasul de elice are o mărime de 3,4 nm (Figura 8).

Stabilitatea acestei structuri spațiale de tip dublă elice a ADN este extrem de crescută și este asigurată de o serie întreagă de interacții.

Un prim factor care contribuie la stabilitatea duplexului este reprezentat de interacțiile hidrofobe și cele de stivuire care apar între bazele azotate din structură. Planurile heterociclor bazelor azotate tind să evite orice contact cu mediul apos înconjurător și interacționează între ele formând o conformație stivuită.

O altă contribuție la stabilitatea dublului helix o au punțile de hidrogen stabilite pe bază de complementaritate. Interacțiunile ionice care apar între grupările fosfat încărcate negativ dispuse la exteriorul helixului forțează structura să adopte o conformație relativ rigidă, stabilizând-o.

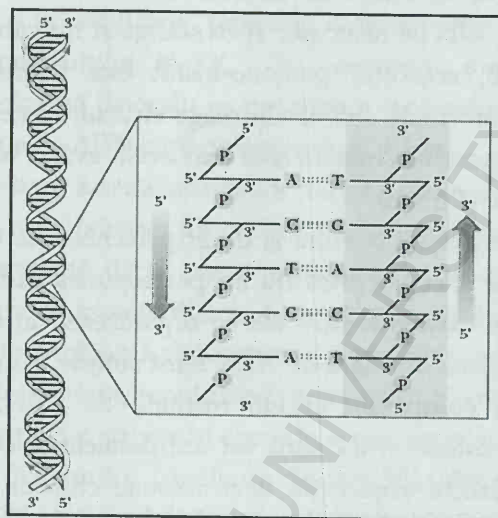


Figura 8. Modelul Watson-Crick al ADN. Se observă cele două catene antiparalele și legăturile de hidrogen stabilite pe bază de complementaritate între bazele azotate (după Garrett și Grisham, Biochemistry, 2005).

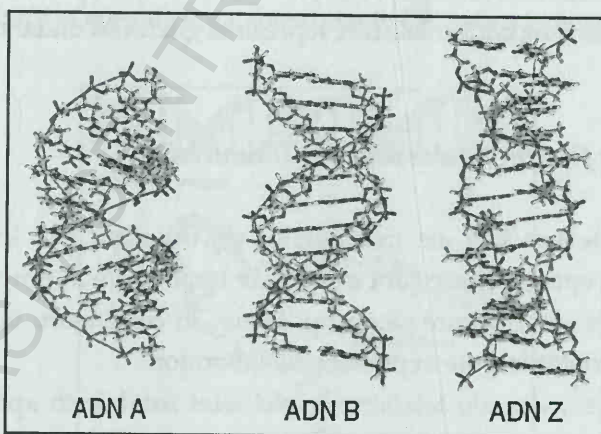


Figura 9. Conformațiile posibile ale dublului helix ADN.

În condiții fiziologice și în soluție, moleculele de ADN se află în forma descrisă de Watson și Crick, iar această formă reprezintă conformația de tip B (ADN B). În natură există și alte două tipuri de conformații ale ADN: A și Z (Figura 9).

Conformația de tip A este mult mai compactă, diametrul helixului este mai mare decât cel al tipului B, iar pasul de helix este mai scurt (2,8 nm). De asemenea, planurile bazelor azotate nu mai sunt perpendiculare pe axa centrală a structurii, ci sunt răsucite sub un anumit unghi.

Conformația de tip Z este total diferită față de celelalte două descrise până acum. Întregul dublu helix se răsucește spre stânga și nu către dreapta ca în cazul conformațiilor A și B, scheletul pentozo-fosfat este dispus în zig-zag, bazele pirimidinice capătă conformații *anti*, iar întreaga structură este mai accesibilă față de tipurile A sau B. De asemenea, helixul este mai zvelt, având un diametru mai mic și pasul de elice mai mare (4,6 nm).

În cazul ARN, forțele de stivuire și de împerechere ale bazelor pot determina structuri sub formă de elice. Acestea nu au perfecțiunea dublului helix ADN, dar împreună cu regiunile existente între ele se organizează în structuri definite prin noțiunea de motive. Elicele formate de ARN sunt simple, neregulate și se întind pe distanțe scurte. Dacă comparăm elicele formate de ARN, respectiv de ADN, observăm că dublele catene ARN sunt tot antiparalele și complementare, dar la nivelul lor apar și perechi atipice de baze azotate cum ar fi guanină-uracil sau inozină-guanină, inozină-adenină și inozină-citozină. Într-o moleculă de ARN monocatenară, împerecherea bazelor se face pe lungimi variabile de la una la mai multe zeci de perechi de baze (Costache și Dinischiotu, 2004). Diferitele elice, formate împreună cu segmentele aleatoare neîmperecheate care le separă, desemnează câteva structuri bine definite și reproductibile care reprezintă gradul secundar de organizare.

1.1.3 Proprietățile fizico-chimice ale acizilor nucleici

Caracteristicile speciale ale moleculelor de acizi nucleici le conferă acestora diferite proprietăți specifice care sunt extrem de importante în timpul procedeele de extracție, purificare, cuantificare sau amplificare. În continuare vom enumera doar câteva dintre proprietățile utile în practica de laborator:

1. Sărurile de sodiu ale acizilor nucleici sunt solubile în apă și dau soluții cu vâscozitate crescută. Această proprietate este extrem de importantă în desfășurarea procedeele de extracție și purificare. Soluțiile saline concentrate conduc la precipitarea proteinelor dar mențin în soluție acizii nucleici.

2. Alcoolii, în special izopropanolul și etanolul, sunt utilizați pentru precipitarea acizilor nucleici din soluție. Izopropanolul este unul dintre cei mai des utilizați agenți de precipitare ai ADN în protocoalele de extracție.
3. Densitatea moleculelor de acizi nucleici este ridicată și permite separarea lor prin tehnici de ultracentrifugare. De exemplu, ultracentrifugarea în gradient de densitate la echilibru permite determinarea masei moleculare și evaluarea conținutului în GC. De asemenea, prin ultracentrifugare în gradient de clorură de cesiu se pot separa moleculele de ADN și ARN sau chiar molecule de ADN care conțin izotopi diferiți.
4. Conținutul în baze azotate al acizilor nucleici conferă un maxim de absorbție în UV la 260 nm. Valoarea absorbanței la 260 nm este de aproximativ 30 de ori mai importantă decât cea a proteinelor cu o concentrație egală, dar inferioară bazelor azotate libere. Această proprietate a acizilor nucleici este esențială în determinarea concentrației și purității acestora.
5. Procesul de denaturare/renaturare reprezintă o alterare, respectiv o refacere totală sau parțială a structurii spațiale a macromoleculelor de acizi nucleici fără ruperea legăturilor covalente (Figura 10). Denaturarea și renaturarea termică a ADN sunt modalități importante de studiu a acestei molecule.

Fenomenul de denaturare se manifestă la încălzirea unei soluții de ADN. Creșterea temperaturii este însoțită de ruperea legăturilor de hidrogen dintre cele două catene și de modificări majore ale proprietăților fizice ale moleculei cum ar fi pierderea vâscozității și amplificarea absorbției în UV (efect hiperchrom).

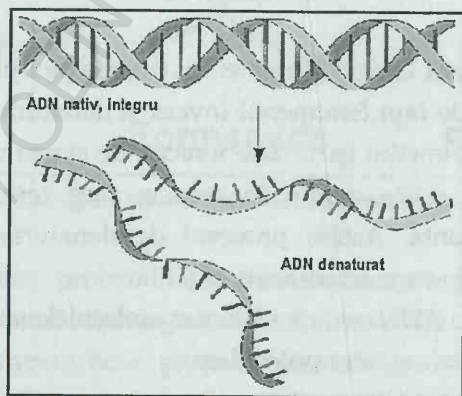


Figura 10. ADN nativ și ADN denaturat.

Efectul de hiperchromicitate este o modificare informativă pentru studiul fenomenului de denaturare. Din starea nativă, dublu catenară, molecula trece în

starea denaturată prin ruperea legăturilor de hidrogen și a contactelor Van der Waals care asigură stivuirea bazelor azotate. Temperatura separă treptat, complet sau incomplet cele două catene care își pierd forma de dublă helix și adoptă o conformație aleatoare. Acest fenomen generează creșterea absorbției în UV, la 260 nm, datorită expunerii bazelor azotate care până în acel moment erau mascate (Figura 11).

Un factor important implicat în procesul de denaturare este concentrația în săruri a mediului. Astfel, ionii anorganici neutralizează sarcinile scheletului pentozofosfat și anulează repulsiile electrostatice care destabilizează dublul helix.

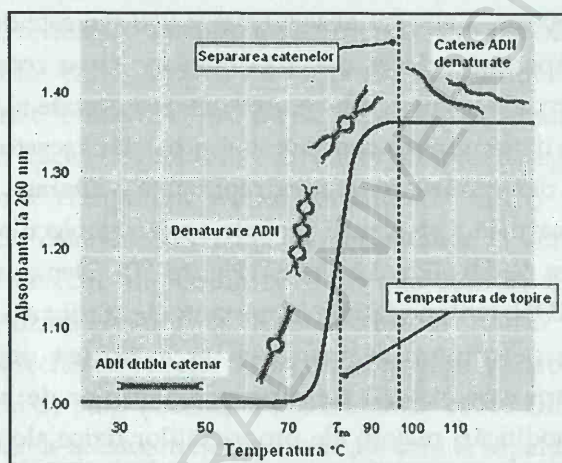


Figura 11. Efectul hipercrom al ADN datorat procesului de denaturare. Determinarea temperaturii de topire (T_m).

Renaturarea se referă la restaurarea stării inițiale de dublu helix, plecând de la ADN denaturat și este de fapt fenomenul invers al denaturării. Succesul renaturării depinde de condițiile de mediu (pH, tărie ionică), de starea mai mult sau mai puțin avansată a denaturării și de modul în care se face revenirea la o valoare de temperatură nendenaturantă. Astfel, procesul de denaturare/renaturare parcurge diferite etape în funcție de protocolul utilizat:

i) dacă soluția de ADN este răcită brusc moleculele sunt „înghețate” în starea imperfectă de cupluri inter- și intramoleculare;

ii) dacă soluția este răcită treptat se observă o revenire gradată la proprietățile caracteristice structurii bicatenare. Acest fenomen are loc deoarece este asigurată durată necesară pentru regăsirea bazelor complementare de pe cele două catene și pentru refacerea legăturilor de hidrogen. Aceste condiții au fost denumite „de anelare”.

Denaturările și renaturările sunt etape cheie pentru numeroase tehnici de biologie moleculară. Astfel, hibridizările acizilor nucleici, procese importante în multe tehnici de laborator, presupun formarea de duplexuri artificiale între ADN din diferite surse sau între ADN și ARN. Regiunile de ARN al căror lanț monocatenar se repliază pentru a forma o structură de dublu helix prezintă același fenomen de denaturare în condiții de temperatură crescută.

Există o serie de alți factori care au acțiune denaturantă asupra ADN. De exemplu, valorile extreme de pH dezorganizează împerecherile modificând ionizarea grupărilor de la nivelul bazelor azotate. Tratamentul alcalin este o metodă importantă care este folosită în tehnicile de biologie moleculară pentru denaturarea ADN. Acesta reprezintă o modalitate reversibilă de a obține molecule de ADN monocatenare care sunt foarte utile etapelor de hibridizare din tehnicile *Southern* și *Northern Blotting*.

Compușii organici ca aldehida formică, formamida sau ureea au capacitatea de a stabili legături de hidrogen cu bazele azotate și sunt utilizați ca agenți denaturanți în tehnicile de separare a acizilor nucleici cum ar fi de exemplu electroforeza (Figura 12). Faptul că acțiunea lor necesită accesul la perechile de baze azotate din interiorul dublului helix a condus la apariția unui concept de structură dinamică a ADN, în care există regiuni care se desfac tranzitoriu și apoi se reîmperechează.

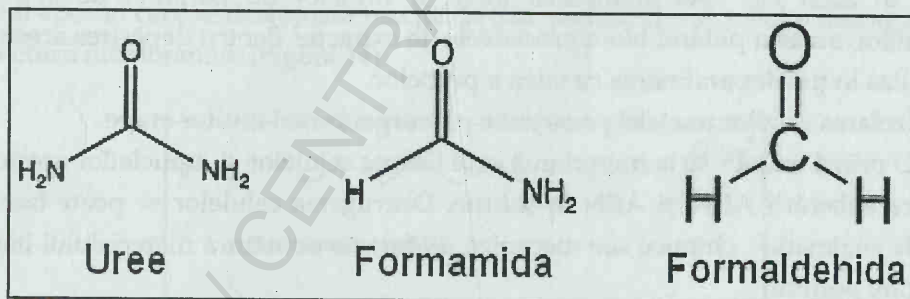


Figura 12. Agenți chimici denaturanți ai acizilor nucleici.

De reținut că *in vivo* probabilitatea de denaturare a ADN în condiții de pH, forță ionică și temperatură fiziologică este minimă. Cu toate acestea, existența procesului activ de împerechere parțială este obligatoriu pentru procesele de replicare și transcripție. De asemenea, proteinele care se leagă la ADN inhibă, în cea mai mare parte, denaturarea. Cu toate acestea, în funcție de starea fiziologică a celulei, numeroase proteine pot destabiliza dubla elice.

I.2 Izolarea și purificarea acizilor nucleici

Majoritatea protocoalelor de lucru din biologia moleculară utilizează probe de ADN sau ARN. Acizii nucleici pot proveni din diferite surse biologice: țesut animal sau vegetal, culturi bacteriene, culturi celulare, sânge, material seminal, fire de păr etc. Pentru izolarea și purificarea ADN și ARN se pot folosi protocoale diverse având la bază procedee clasice sau kituri de extracție.

La ora actuală, datorită multiplelor avantaje oferite de tehnica modernă, cantitățile de acizi nucleici necesare pentru realizarea experimentelor au scăzut extrem de mult. Practic, în anumite tehnici de laborator sunt suficiente cantități din acizii nucleici de ordinul nanogramelor sau chiar a picogramelor. Toate acestea au condus la scurtarea timpului necesar izolării ADN sau ARN de la câteva zile la câteva ore și, totodată, au dus și la simplificarea metodelor aplicate pentru extracție și purificare.

În momentul realizării practice a protocoalelor de izolare metoda de lucru trebuie aleasă și optimizată în funcție de tipul probelor biologice și de modul în care acestea se prezintă. De exemplu, țesuturile incluse în parafină sunt folosite la ora actuală ca material biologic pentru extracția ADN. Principalul impediment care apare în acest caz este eliminarea totală a urmelor de parafină de la nivelul secțiunilor, aceasta putând bloca procedeele de extracție. Pentru depășirea acestuia se va realiza inițial deparafinarea cu xilen a probelor.

Izolarea acizilor nucleici presupune parcurgerea mai multor etape.

O primă etapă foarte importantă este lizarea celulelor și a nucleilor acestora în vederea eliberării ADN și ARN în soluție. Distrugerea celulelor se poate face prin metode enzimatice, chimice sau mecanice, în funcție de natura materialului biologic de la care pornim.

Compoziția chimică a membranelor celulare de la procariote și eucariote nu variază foarte mult. În structura membranelor întâlnim aceleași clase mari de compuși: lipide, proteine și glucide. Lipidele reprezintă cea mai importantă clasă de compuși din alcătuirea membranelor. Ele formează la acest nivel un bistrat datorită caracterului lor amfipatic (prezintă un cap hidrofil sau polar orientat spre mediul extern și o coadă hidrofobă sau nepolară orientată spre interior – Figura 13). La nivelul membranelor celulare există trei clase de compuși: fosfolipidele, glicolipidele și colesterolul, dintre care fosfolipidele sunt cele mai abundente.

Metodele mecanice sunt reprezentate de mojarare sau omogenizare, în aceste

cazuri fiind de preferat ca țesutul să fie înghețat în prealabil.

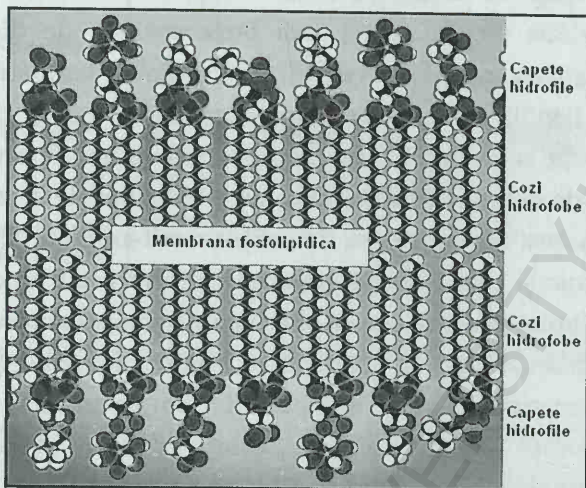


Figura 13. Structura bistratului fosfolipidic al membranei celulare.

Metodele chimice folosesc pentru liza membranelor celulare soluții saline concentrate și soluții de detergenți. Detergenții sunt molecule bipolare care prezintă un capăt puternic hidrofob și unul puternic hidrofil. Datorită acestei particularități ei pot interacționa atât cu bistratul lipidic care formează membrana celulară, cât și cu mediul apos în care se desfășoară reacția de liză, realizându-se astfel o dezorganizare a structurii membranare (Figura 14).

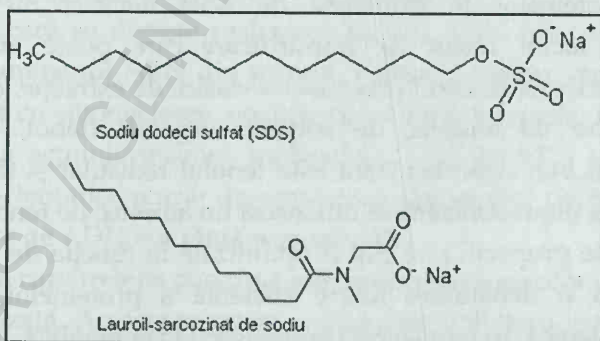


Figura 14. Structurile chimice a doi detergenți utilizați pentru liza membranelor celulare.

În cazul celulelor bacteriene sau vegetale trebuie depășit și un alt impediment. Aceste celule posedă în afară de membrană și un perete celular rigid, constituit de regulă din peptidoglicani în cazul bacteriilor sau din polizaharide în cazul plantelor.

Pentru distrugerea peretelui peptidoglicanic al bacteriilor se apelează la metode enzimatică care utilizează lizozimul, enzimă capabilă să lizeze peptidoglicanii. În cazul peretelui celulei vegetale, cele mai bune metode de distrugere sunt cele mecanice. Astfel, inițial, materialul vegetal este plasat la temperaturi foarte scăzute (înghețat pe azot lichid), iar ulterior se realizează o mojarare directă în diferitele tampoane de extracție care conțin detergenți și soluții salină concentrate.

Un exemplu de detergent folosit în cazul extracțiilor de acizi nucleici din țesut vegetal sau din bacterii este bromura de cetil-trimetil-amoniu (CTAB). Aceasta este un detergent neionic și este utilizată pentru a elibera acizii nucleici din celulă și, ulterior, pentru a forma un complex insolubil cu aceștia la concentrații de clorură de sodiu sub 0,5 M. În acest timp, polizaharidele, compușii fenolici și alți contaminanți specifici plantelor precipită și pot fi îndepărtați. Complexul acizi nucleici-CTAB este solubil numai în soluții salină concentrate. Prin creșterea treptată a concentrației de clorură de sodiu complexul disociază și CTAB poate fi îndepărtat.

Alte exemple de detergenți utilizați în procedeele de extracție ale acizilor nucleici sunt sodiu dodecil sulfatul (SDS) sau lauroil-sarcozinatul de sodiu.

În cazul în care se pornește extracția de la probe biologice atipice, procedeele aplicate se vor modifica în funcție de natura acestora. De exemplu, în cazul probelor de material seminal trebuie ținut cont că acestea sunt foarte bogate în glucide care necesită un tratament special de îndepărtare.

O altă etapă extrem de importantă a procedeele de izolare și purificare este realizarea deproteinizării extractelor.

Prezența proteinelor în extractele de acizi nucleici nu este dorită, ele reprezentând un factor major de impurificare care poate afecta semnificativ experimentele ulterioare. În cazul procedeele clasice de extracție, deproteinizarea se realizează utilizând un amestec de solvenți organici (fenol, cloroform, alcool izoamilic). Cel mai bun deproteinizant este fenolul redistilat și tamponat cu TRIS. Pentru optimizarea deproteinizării se utilizează un amestec de fenol:cloroform:alcohol izoamilic în diferite proporții care pot fi optimizate în funcție de tipul de extracție. Fenolul realizează o denaturare foarte eficientă a proteinelor, solubilizându-le ulterior în faza organică. În momentul centrifugării faza fenolică, mai grea decât cea apoasă, ajunge pe fundul tubului împreună cu resturile proteice solubilizate la nivelul acesteia (Figura 15). Totodată, cloroformul este un agent denaturant al proteinelor destul de eficient iar alcoolul izoamilic are proprietatea de a stabiliza interfața instabilă dintre faza apoasă și cea fenolică, separate prin centrifugare.

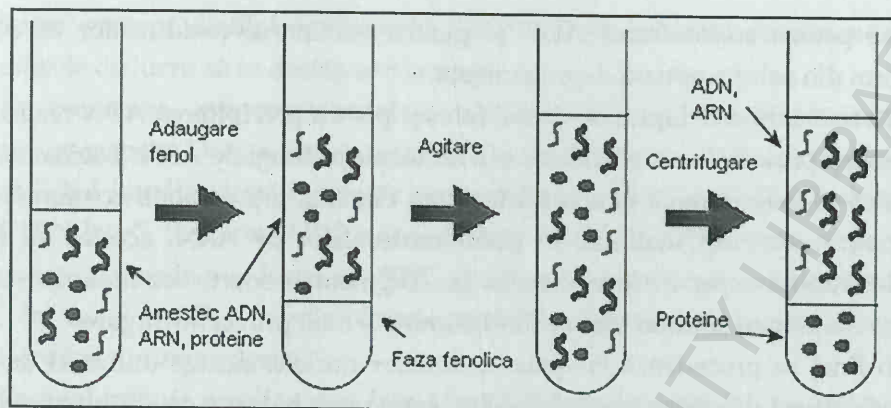


Figura 15. Realizarea deproteinizării extractului cu ajutorul fenolului.

Amestecul fenol-cloroform are și rolul de a reduce cantitatea de soluție apoasă reținută la nivelul fazei organice, realizând astfel o concentrare a ADN și deci o creștere a randamentului de extracție. Alcoolul izoamilic previne amestecarea celor două faze, organică și apoasă. După tratarea extractului cu amestecul de solvenți este absolut necesară o etapă de centrifugare pentru separarea rapidă a fazei organice de cea apoasă. Faza apoasă, care conține dizolvați acizii nucleici, este astfel separată și transferată într-un alt tub de reacție.

Pentru a crește randamentul etapei de deproteinizare este recomandat un tratament enzimatic cu proteinază K sau pronază (amestec de enzime proteolitice). Aceste enzime fragmentează proteinele cu masă moleculară mare rezultând amestecuri de oligopeptide mult mai ușor de îndepărtat.

În cazul în care se dorește realizarea izolării ADN este neapărat necesar să îndepărtăm contaminanții ARN din extract. Pentru a realiza practic acest lucru se face un tratament cu ribonucleaze, enzime care clivează specific numai fragmentele de ARN. În urma acțiunii enzimei, moleculele lungi de ARN vor fi secționate în molecule oligonucleotidice scurte de maximum câteva zeci de perechi de baze, în timp ce moleculele de ADN vor rămâne neafectate.

A treia etapă care trebuie parcursă este precipitarea acizilor nucleici din soluția apoasă deproteinizată. Aceasta se poate realiza prin utilizarea izopropanolului care, în paralel, realizează și desalifierea soluției.

ADN poate fi concentrat și desalifiat și prin precipitare cu etanol absolut. În prezența unei concentrații relativ crescute de cationi monovalenți (între 0,1 și 0,5 M), etanolul induce o modificare conformațională a ADN, cauzând agregarea și precipitarea acestuia din soluție. Precipitarea cu etanol absolut este extrem de

eficientă pentru concentrarea ADN și pentru eliminarea reziduurilor de fenol și cloroform din soluția apoasă deproteinizată.

De remarcat este faptul că alcoolii folosiți pentru precipitarea ADN realizează și precipitarea proteinelor, a glucidelor și a moleculelor lungi de ARN. Tocmai de aceea trebuie să ne asigurăm că în această fază am eliminat toți posibili contaminanți de tipul celor enumerați mai sus. În cazul moleculelor de ARN, acestea au fost în prealabil supuse acțiunii ribonucleazei, iar fragmentele scurte rezultate vor rămâne dizolvate la nivelul soluției apoase fiind eliminate total prin centrifugare.

În final se procedează la spălarea acizilor nucleici extrași utilizând de obicei soluții de etanol diluate (circa 70%). ADN extras este hidratat cu soluții tampon sau cu apă și stocat la 4°C, pe termen scurt, sau la -20°C, pe termen mai lung. În aceste cazuri trebuie evitate ciclurile repetate de îngheț-dezgheț.

În cazul extracției acizilor nucleici din țesuturi vegetale trebuie ținut cont de faptul că acestea sunt bogate în nucleaze. În acest caz se recomandă ca extracția să pornească de la probe înghețate sau să fie realizată în prezența unor concentrații crescute de detergenți și EDTA.

În cazul extracției ARN se pot utiliza mai multe protocoale. Astfel, după parcurgerea etapelor normale pentru izolarea acizilor nucleici, ADN este degradat enzimatic folosind deoxiribonucleaze, în extract rămânând exclusiv ARN. Deoxiribonucleazele sunt enzime specifice care realizează clivarea specifică a moleculelor de ADN. În cazul în care are loc distrugerea peretelui celular, aceasta este urmată de un tratament cu detergenți.

Pentru realizarea extracției ARN din diverse probe biologice cum ar fi celulele în cultură sau fragmentele de țesut se poate utiliza guanidin-tiocianatul. Acesta este unul dintre cei mai eficienți agenți denaturanți ai proteinelor. Ulterior, omogenatele biologice sunt amestecate în mai multe etape cu soluții de acetat de sodiu, fenol și cloroform/alcool izoamilic. În urma centrifugării, în faza superioară apoasă separată, se va regăsi ARN total, iar în faza inferioară, organică, se vor găsi proteinele și ADN. La baza tehnicii stă proprietatea ARN de a rămâne solubilizat într-o soluție apoasă care conține guanidin-tiocianat și amestec fenol/cloroform/alcool izoamilic, la o valoare de pH în jur de 4. În aceleași condiții proteinele și fragmentele mici de ADN (cu mărimi între 50 pb și 10 Kpb) trec în faza organică, iar fragmentele mai mari de ADN se regăsesc la interfața celor două faze.

Cea mai mare problemă la izolarea ARN este prezența ribonucleazelor. Acestea sunt enzime destul de stabile și foarte active, de aceea se recomandă inactivarea lor încă din faza prelevării probelor. Pentru aceasta se folosesc diferite substanțe

inhibitoare precum dietilpirocarbonatul (DEPC). Totodată este absolut necesar ca toate etapele de lucru să se desfășoare la rece.

De asemenea, este recomandat ca extracția ARN să se realizeze din probe biologice proaspete. Dacă acest lucru nu este posibil apare necesitatea crioconservării pe azot lichid imediat după prelevare sau a utilizării unor soluții stabilizatoare cum ar fi "ARN later". Stocarea ARN extras se face numai la -20°C , chiar și pe termen scurt, iar pe perioade mai lungi, la -80°C , stabilizat în soluții tampon specifice. La fel ca și în cazul ADN, trebuie evitate ciclurile repetate de îngheț-dezgheț și contaminarea cu ribonucleaze.

La final trebuie menționat că la ora actuală sunt dezvoltate o serie întreagă de protocoale de extracție a acizilor nucleici care folosesc kituri gata preparate. Acestea au o eficiență crescută de izolare și asigură un timp scurt de lucru. La baza metodologiilor utilizate de aceste kituri stau folosirea unor minicoloane cu rășini schimbătoare de ioni, a membranelor cu silice sau a bilelor magnetice care pot lega specific moleculele de acizi nucleici.

De exemplu, rășinile schimbătoare de anioni, cum este dietilaminoetil-celuloza, sunt în mod normal încărcate pozitiv și leagă acizii nucleici prin intermediul grupărilor fosfat încărcate negativ. În acest caz, legarea se realizează la concentrații saline scăzute, iar eluarea acizilor nucleici de pe coloană este posibilă în momentul creșterii concentrațiilor, acestea având drept efect ruperea legăturilor ionice.

I.3 Determinarea spectrofotometrică a purității și concentrației acizilor nucleici

Înainte de a folosi acizii nucleici izolați pentru diverse manipulări moleculare, este necesar să se verifice puritatea și integritatea acestora.

Pentru a aprecia gradul de puritate al unui extract ADN este necesară citirea spectrofotometrică a valorii absorbanței la mai multe lungimi de undă. În acest sens este absolut necesară folosirea unor cuve de cuarț sau material plastic special care permit trecerea radiațiilor luminoase din spectrul UV.

Moleculele acizilor nucleici conțin în structura lor baze purinice și pirimidinice care pot fi ușor detectate datorită absorbției puternice a luminii ultraviolete. Bazele purinice, nucleozidele și nucleotidele derivate de la acestea au absorbții mai puternice decât pirimidinele și derivații lor. Lungimea de undă la care se înregistrează absorbție maximă variază, în particular, în funcție de baza azotată din compoziție, dar în majoritatea cazurilor este apropiată de 260 nm. Spectrul UV

pentru fiecare dintre aceste nucleozide sau derivații lor nucleotidici poate fi diferit în funcție de pH (Figura 16).

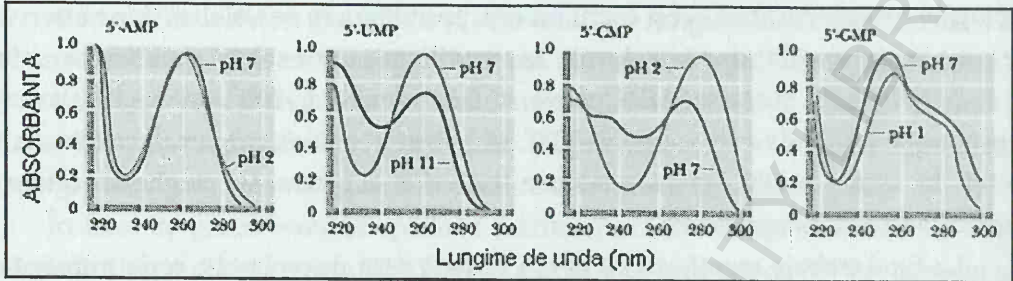


Figura 16. Spectrele de absorbție în funcție de valoarea de pH pentru cele patru ribonucleotide din structura ARN (după Garrett și Grisham, Biochemistry, 2005).

Absorbanțele puternice în domeniul UV furnizează metode sensibile de dozare a acestor compuși atât din punct de vedere calitativ, cât și cantitativ. De asemenea se recomandă și determinarea întregului spectru de absorbție al probei în domeniul 200–380 nm, pentru a putea evidenția astfel eventualii contaminanți din extract care pot prezenta maxime de absorbție la alte lungimi de undă decât cele de interes (Figura 17).

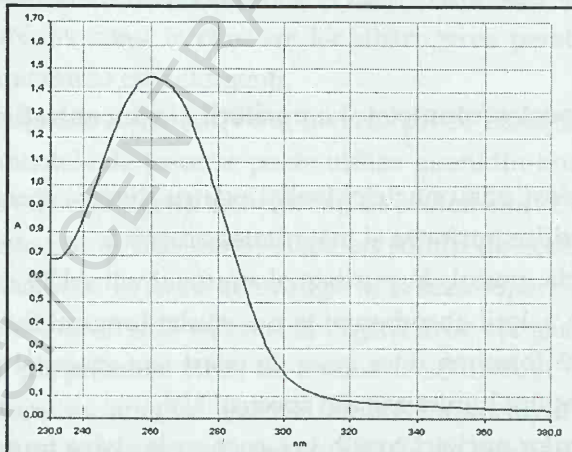


Figura 17. Spectrul de absorbție al unei soluții de ADN între 230 și 380 nm.

Verificarea purității ADN se realizează spectrofotometric ținând cont de următoarele considerente:

- moleculele de ADN monocatenar (ADNmc) sau dublucatenar (ADNdc) prezintă absorbantă maximă la lungimi de undă care variază între 257 și 260 nm;

- absorbanta maximă pentru moleculele proteice rămase eventual în extract este la 280 nm;
- absorbanta maximă pentru moleculele de glucide rămase eventual în extract este la 230 nm;
- absorbanta prezentă la 220 nm este datorată oligonucleotidelor rezultate din fragmentarea ADN în timpul extracției.

În funcție de valorile A_{260} și A_{280} se poate stabili gradul de contaminare proteică sau de contaminare cu ARN a ADN extras astfel:

- raportul A_{260}/A_{280} optim este cuprins între 1,8 și 2;
- un raport mai mic de 1,8 ne indică o contaminare cu proteine a extractului;
- un raport mai mare de 2 ne indică o contaminare cu ARN a extractului.

În funcție de valorile A_{260} și A_{230} se poate stabili gradul de contaminare cu polizaharide a ADN extras astfel:

- raportul A_{260}/A_{230} optim este mai mare ca 2;
- un raport mai mic de 2 ne indică o contaminare cu polizaharide a extractului.

Cea mai simplă metodă de determinare a concentrației acizilor nucleici dintr-un extract se bazează pe citirea absorbanței la 260 nm și apoi pe folosirea următoarelor formule:

$A_{260} = 1$ corespunde la 50 μg ADNdc/ml;

$A_{260} = 1$ corespunde la 33 μg ADNmc/ml;

$A_{260} = 1$ corespunde la 40 μg ARN/ml;

$A_{260} = 1$ corespunde la 20 μg oligonucleotide/ml.

Este totuși recomandabil ca determinarea concentrației acizilor nucleici pe baza valorii de absorbantă la 260 nm să fie corelată și cu aspectul ADN în gel de electroforeză.

Absorbanța unei soluții de ADN la 260 nm reprezintă mai puțin de 40% din valoarea obținută prin însumarea absorbanțelor tuturor bazelor azotate componente datorită intervenției forțelor de stivuire care contribuie la mascarea acestora în structura macromoleculei de ADN. Fenomenul poartă numele de **efect hipocromic** al ADN. Prin încălzirea și/sau denaturarea moleculei de ADN se observă apariția **efectului hipercromic**. Efectul se concretizează prin creșterea absorbanței și este cauzat atât de ruperea legăturilor de hidrogen, cât și de dispariția forțelor de stivuire din structura macromoleculei.

Atunci când se urmărește determinarea concentrației și purității unei soluții de ARN se realizează citiri ale absorbanței la aceleași lungimi de undă ca și în cazul soluțiilor de ADN (260, respectiv 280 nm). Totuși, raportul A_{260}/A_{280} este puternic

influențat de pH. Astfel, la valori scăzute de pH raportul va suferi o scădere considerabilă, acest lucru conducând la erori în ceea ce privește estimarea contaminării cu proteine a soluției de analizat. Pentru determinări de mare acuratețe se recomandă măsurarea absorbanțelor în soluții tampon cu pH ușor bazic (ex. soluție 10 mM TRIS-HCl, pH 7,5). Un raport de puritate excelent pentru o soluție de ARN se va încadra între 1,9 și 2,1.

În ceea ce privește contaminarea extractului ARN cu ADN, nicio metodă de purificare nu ne poate garanta o purificare totală. Urme de ADN sunt de obicei prezente în probele de ARN extras chiar și atunci când la electroforeza în gel de agaroză nu se observă nicio contaminare.

Pentru evaluarea integrității extractului de ARN total se poate realiza o electroforeză în gel de agaroză. În cazul unui ARN integru vor putea fi observate benzi tipice, bine delimitate, pentru moleculele de ARN ribozomal 28S, 18S și chiar și 5S (Figura 18). În cazul în care aceste benzi nu sunt clar evidențiate și au un aspect difuz înseamnă că ARN total a început să sufere un proces de degradare. În cazul unei degradări totale benzile sunt inexistente.

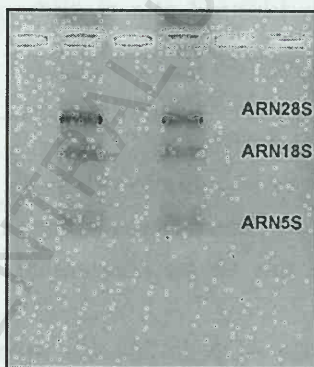


Figura 18. Electroforeză în gel de agaroză pentru evidențierea gradului de degradare al ARN.

La ora actuală există bioanalizoare moderne care realizează electroforeze de acizi nucleici în microcipuri fluidice. Avantajul constă în acuratețea mare a determinărilor, reproductibilitate și necesitatea unei cantități minime de probă de analizat.

Microcipurile conțin o serie de minigodeuri dispuse la nivelul unei structuri suport și o rețea de microcanale corespunzătoare fiecărui godeu. Astfel, procesul de electroforeză este miniaturizat și total automatizat. Electroforezele sunt interpretate

grafic, iar din rezultatele obținute se poate determina foarte clar gradul de degradare al ARN (Figura 19).

Pentru moleculele de ARN analizate, software-uri specializate calculează și valoarea RIN (*RNA Integrity Number*). RIN este de fapt un algoritm de calcul al calității și integrității ARN extras pe baza analizei ARNr 18S și ARNr 28S. Valorile RIN sunt cuprinse între 1 și 10, unde 1 corespunde unui ARN foarte degradat, iar 10 unui ARN de cea mai bună calitate, nedegradat.

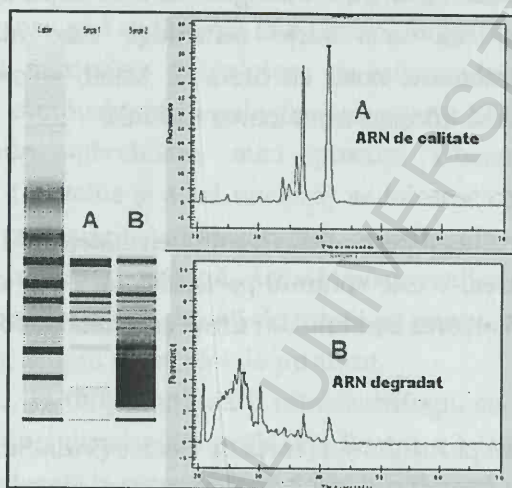


Figura 19. Electroforeză în microcipuri pentru evidențierea gradului de degradare al ARN.

I.4 Ultracentrifugarea

Metodele de centrifugare realizează separarea moleculelor biologice în funcție de densitățile lor caracteristice. Acestea pot fi reprezentate de proteine, acizi nucleici, nuclei, mitocondrii, ribozomi, virusuri etc. În cazul aplicării unei forțe centrifuge, particulele au tendința de a se scufunda prin mediul de centrifugare atunci când densitatea acestuia este mai mică decât densitatea lor. Acest fenomen este numit și sedimentare. Viteza de sedimentare a particulelor la nivelul mediului de centrifugare este direct proporțională cu diferența de densitate dintre particule și mediu.

La începutul centrifugării, amestecul care conține substanțele care trebuie separate este depus la suprafața lichidului. În cursul centrifugării, moleculele coboară în funcție de densitatea lor. Viteza de sedimentare este exprimată printr-o unitate independentă de densitatea mediului numită coeficient de sedimentare,

măsurată în unități Svedberg (S). Cu cât valoarea coeficientului de sedimentare este mai mare, cu atât molecula va ajunge mai repede în partea inferioară a tubului. La sfârșitul centrifugării, tubul conține două faze distincte: un depozit mai mult sau mai puțin compact în partea inferioară, care corespunde moleculelor care au reușit să se depună și care se numește **sediment**, și o fază lichidă care conține toate celelalte molecule și care formează **supernatantul**. După caz, moleculele de separat sunt în sediment, în supernatant sau distribuite între cele două.

Deci tendința oricărei particule biologice de a se deplasa printr-un mediu de centrifugare sub acțiunea unei forțe centrifuge este măsurată cu ajutorul coeficientului de sedimentare, notat cu litera S. Astfel, valoarea coeficientului de sedimentare se calculează folosind următoarea formulă:

$$S = (r_p - r_m) \cdot V / f$$

unde, r_p este densitatea particulei, r_m este densitatea mediului sau a soluției în care se face centrifugarea, V este volumul particulei, iar f este coeficientul de frecare (Vida-Simiti I., 2006). Valoarea acestuia din urmă este dată de formula:

$$f = F_f / v$$

unde, v este viteza particulei și F_f forța de frecare (Vida-Simiti I., 2006).

Particulele cu forme neregulate prezintă coeficienți mari de frecare și, ca urmare, coeficienți mici de sedimentare. Ca atare, cu cât o particulă este mai mică și are o formă mai neregulată, cu atât aceasta va sedimenta mai greu la centrifugare. Pentru a separa și purifica astfel de molecule este nevoie de câmpuri centrifugale uriașe care nu pot fi obținute decât prin ultracentrifugare. Câmpul centrifugal este exprimat relativ la accelerația gravitațională terestră (RFC = câmp centrifugal relativ) folosind relația:

$$RFC = \omega^2 r / g$$

unde $\omega^2 r$ este accelerația unghiulară sau câmpul centrifugal, iar g este accelerația gravitațională (Vida-Simiti I., 2006).

Particulele biologice se pot împărți în trei grupe, în funcție de modul în care se comportă la centrifugare:

- i. cele care se poziționează la baza tubului de centrifugă;
- ii. cele care urcă spre suprafață;

iii. cele care continuă să rămână în suspensie.

În concluzie, dacă modulăm corect densitatea mediului de centrifugare este posibilă purificarea unei molecule.

Viteza de sedimentare a unei particule biologice este proporțională cu pătratul razei acesteia, cu diferența densităților și cu tăria câmpului centrifugal aplicat. Deci pentru un câmp centrifugal dat viteza de sedimentare scade cu pătratul razei particulei. Astfel, un câmp centrifugal mic (600 g) este capabil să sedimenteze doar particule mari precum celulele vegetale sau animale și precipitatele proteice. Nucleii celulelor, particule dense, pot sedimenta la o tărie a câmpului cuprinsă între 800 g și 1500 g. Bacteriile și particulele subcelulare ca mitocondriile și lizozomii pot fi sedimentate folosind câmpuri centrifugale de aproximativ 10000 g.

Pentru particule subcelulare mici precum ribozomii, dar și pentru macromolecule mari (proteine și acizi nucleici) se folosesc câmpuri centrifugale de 100.000 g sau chiar mai mari. Aceste câmpuri centrifugale extrem de mari pot fi produse numai de către ultracentrifugă. Aceasta poate realiza separarea preparatelor biologice la viteze de mii sau zeci de mii de rotații pe minut, acționând cu accelerații de mai multe mii de g asupra moleculei de purificat.

Din acest motiv, în timpul utilizării ultracentrifugii, se ridică două probleme: dezechilibrul rotorului și degajarea de căldură. Pentru a întâmpina aceste probleme camera rotorului este legată la sisteme de răcire și la o pompă de vid. Aceasta asigură condiții de vid relativ care reduce la maxim frecarea dintre rotor și aer (Figura 20). De asemenea, rotoarele folosite la ultracentrifugare trebuie să respecte norme stricte, fiind realizate din aliaje speciale pe bază de aluminiu sau titan.

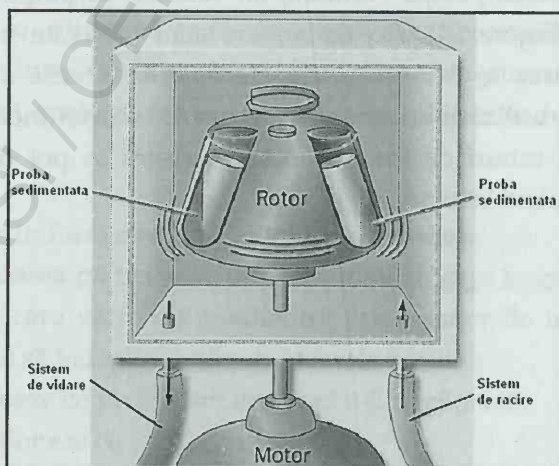


Figura 20. Reprezentarea schematică a unei ultracentrifuge cu sistemele de răcire și vidare.

Pe parcursul utilizării rotoarele vor fi supuse corodării, pe de o parte datorită stresului creat de câmpul centrifugal ridicat care alterează structura cristalină a aliajului, iar pe de altă parte datorită acțiunii compuşilor chimici folosiți în protocoalele de ultracentrifugare. Odată corodate, folosirea rotoarelor devine periculoasă deoarece există un risc foarte mare ca acestea să cedeze în timpul ultracentrifugării. Orice microfisură apărută la nivelul acestora poate conduce în timpul aplicării forțelor uriașe de centrifugare la ruperea rotoarelor și implicit la producerea unor accidente grave.

Rotoarele folosite la ultracentrifugare pot fi împărțite în mai multe tipuri:

a) Rotoare cu unghi fix. În cazul acestora, unghiul la care sunt înclinate tuburile este cuprins între 14 și 40 de grade (Figura 21). Ele sunt ideale pentru colectarea rapidă a precipitatelor din volume mari, dar nu se pretează pentru separarea componentelor cu valori similare ale coeficientului de sedimentare. Sunt avantajoase în ultracentrifugarea izopicnică, în care gradientul de densitate se formează pe o distanță scurtă, astfel încât particula atinge poziția de echilibru rapid. Atunci când rotorul se oprește, gradientul de densitate este reorientat spre verticală, iar benzile obținute în urma centrifugării în partea superioară a tubului se extind, fapt care conduce la creșterea rezoluției de separare.

b) Rotoare cu tuburi verticale. În acest caz tuburile sunt paralele cu axa rotorului. Astfel, sedimentul format se depune de-a lungul peretelui tubului de centrifugă. Aceste rotoare se pretează la ultracentrifugarea izopicnică.

c) Rotoare *swing-out*. În acest caz, suporturile tuburilor se găsesc în momentul inițial al centrifugării în poziție verticală, iar ulterior, în timpul accelerării, trec în poziție orizontală (Figura 21). Aceste rotoare sunt preferate în ultracentrifugarea zonală unde separarea se face în funcție de valorile diferite ale coeficientului de sedimentare. Riscul utilizării acestor rotoare apare datorită modului de prindere a suporturilor pentru tuburi de rotor, deoarece acestea se pot desprinde în timpul centrifugării, conducând la accidente grave.

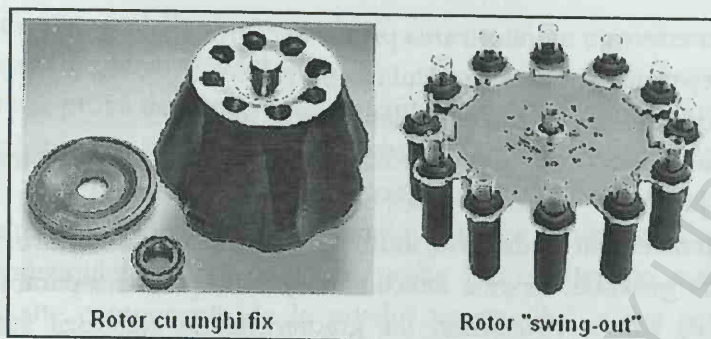


Figura 21. Tipuri de rotoare pentru ultracentrifugă.

Tuburile folosite în ultracentrifugare pot fi confecționate din diverse materiale cum ar fi policarbonatul, polietilena, polipropilena, nitratul de celuloză etc. Aceste materiale sunt selectate în funcție de sensibilitatea lor față de reactivii chimici folosiți în protocoalele de separare prin ultracentrifugare.

Tuburile de centrifugă variază în grosime și rigiditate. Astfel, tuburile cu pereți subțiri pot fi folosite în rotoarele *swing-out* deoarece tubul este protejat de forțele de deformare care apar la viteze mari de centrifugare. Rotoarele cu unghi fix necesită tuburi cu pereți groși deoarece asupra lor se exercită forțe extrem de mari care tind să le fisureze. Ca o precauție, în cazul ultracentrifugării, tuburile trebuie umplute complet cu lichid. De asemenea, tuburile rotoarelor cu unghi fix sau verticale sunt prevăzute cu un capac etanș pentru a menține lichidul în tub, prevenind astfel spargerea lui.

Pentru ca particulele să poată sedimenta când densitatea și vâscozitatea mediului de centrifugare cresc, trebuie folosite câmpuri centrifugale mari care pot fi generate doar de o ultracentrifugă. În acest caz densitatea mediului variază descrescător și continuu de la partea inferioară la cea superioară a tubului. La sfârșitul centrifugării, moleculele vor fi repartizate sub formă de benzi în funcție de densitatea lor.

Medii folosite în formarea gradientelor de densitate

Pentru fracționarea particulelor prin ultracentrifugare în gradient de densitate, alegerea substanței care va forma gradientul este extrem de importantă. În cazul ideal, aceasta trebuie să îndeplinească următoarele condiții:

- să nu reacționeze cu proba care urmează a fi fracționată;
- să nu interacționeze cu tubul de centrifugă;
- să nu interfere cu monitorizarea gradientului;

- să nu interfereze cu monitorizarea probei în cadrul gradientului;
- să fie separată ușor de materialul fracționat.

Pentru formarea gradientelor de densitate se folosesc:

- **medii neionice** – zaharoză (sucroză), glicerol, polizaharide, compuși iodurați - metrizamidă, proteine – albumină serică bovină.
- **medii ionice** – săruri de cesiu, ioduri de sodiu sau potasiu, săruri de rubidiu.

Ca regulă generală, mediile ionice sunt folosite pentru separarea proteinelor, acizilor nucleici sau a virusurilor, iar gradientele de zaharoză sunt folosite în principal pentru separarea organelor celulare.

Substanțe generatoare de gradient neionice:

Zaharoza: Este prima substanță utilizată în obținerea gradientelor. Este inertă față de compușii biochimici, cu excepția unor enzime, și este stabilă în timp. Soluțiile de zaharoză sunt bine caracterizate din punct de vedere al relației dintre concentrație și vâscozitate, densitate și indice de refracție, pe un interval larg de temperatură. Totuși ea are și multe dezavantaje: soluțiile au o tărie osmotică mare, sunt foarte vâscoase, iar particulele nu pot atinge poziția lor izopicnică (de echilibru cu densitatea mediului).

Glicerolul: Se folosește pentru obținerea gradientelor în separările zonale. Soluțiile de glicerol de aceeași densitate cu cele de zaharoză sunt mai vâscoase.

Compușii iodurați: Acești compuși sunt derivați de la acidul triiodobenzenic și au introduși substituenți care să le crească solubilitatea în mediu apos. Un exemplu de astfel de compus este metrizamina. Acesta este o substanță inertă și se pretează pentru separarea majorității particulelor biologice. Se poate elimina ușor prin dializă sau ultrafiltrare. Are dezavantajul prezenței maximului de absorbție la 280 nm și deci probele nu pot fi analizate la această lungime de undă.

Substanțe generatoare de gradient ionice:

Sărurile de cesiu: Sunt cele mai des folosite medii în ultracentrifugare, mai ales în cea izopicnică. Soluțiile utilizate sunt concentrate și au densități foarte mari. Gradientul se poate forma și *in situ*, prin centrifugare, iar panta gradientului depinde de câmpul centrifugal și de substanța folosită. Gradientele de clorură de cesiu sunt folosite pentru a separa diferite tipuri de ADN, în acord cu compoziția lor în nucleotide. Separarea ADN poate fi îmbunătățită prin prezența ionilor de mercur și de argint la nivelul mediului formator de gradient. Ionii de mercur se leagă cu predilecție la zonele bogate în AT, iar cei de argint la cele bogate în GC.

Tipuri de ultracentrifugare

1. Ultracentrifugarea diferențială:

În acest caz proba de interes este centrifugată direct, iar condițiile de lucru sunt selectate astfel încât în timpul analizei aceasta să sedimenteze la baza tubului sub forma unui precipitat. Ulterior, eventualii contaminanți rămași la nivelul supernatantului sunt îndepărtați prin simpla înclinare a tubului. Un dezavantaj al tehnicii îl reprezintă faptul că odată cu proba care se dorește a fi separată pot sedimenta și alte componente de la nivelul amestecului supus centrifugării. De asemenea, dacă substanța de separat este prezentă într-o concentrație foarte mică în amestecul inițial, există riscul ca în urma procesului de centrifugare să se realizeze o insuficientă concentrare a acesteia.

În timpul ultracentrifugării diferențiale se poate observa chiar și lipsa totală a sedimentului. Acest lucru poate fi cauzat de natura substanței care se dorește a fi separată, aceasta rămânând la nivelul supernatantului pe tot parcursul centrifugării. Pentru a preveni acest fenomen este de preferat ca experimentul să se desfășoare la valori g cât mai mari și la temperaturi cât mai scăzute. Astfel, difuzia particulelor va scădea, iar vâscozitatea sedimentului va crește, aceasta conducând la separarea unor cantități din ce în ce mai mari de probă. Un exemplu tipic de centrifugare diferențială îl reprezintă izolarea membranelor celulare.

2. Ultracentrifugarea zonală:

Tehnica asigură separarea componentelor unui amestec heterogen pe baza coeficienților de sedimentare diferiți. Suspensia de particule se depune sub forma unui strat la suprafața unui gradient de densitate, iar în timpul ultracentrifugării aceste particule migrează sub formă de benzi. Gradientul de densitate e foarte important deoarece stabilizează benzile față de curenții de convecție. În acest tip de centrifugare este esențial ca densitatea maximă a gradientului să fie mai mică decât densitatea particulei de interes pentru ca aceasta să poată sedimenta. Rotoarele folosite în acest tip de centrifugare sunt model *swing-out* pentru a minimaliza efectele de perete. Aceste efecte apar deoarece, în timpul centrifugării, particulele lovesc pereții tubului și formează o regiune cu densitate mai mare decât a mediului înconjurător care tinde să coboare spre fundul tubului.

3. Ultracentrifugarea izopicnică:

Această metodă asigură separarea particulelor pe baza densității lor diferite. În mod uzual se folosesc gradientele de clorură sau sulfat de cesiu, iar densitatea

maximă a mediului trebuie să o depășească pe cea a particulelor care urmează a fi separate. Astfel, particulele se vor poziționa în regiunea în care densitatea gradientului este egală cu a lor. Tehnica are aplicații în domeniul separării acizilor nucleici. Densitatea de plutire a acizilor nucleici depinde de compoziția în baze azotate, deci tehnica poate fi utilizată la separarea diferitelor molecule de acest tip dintr-un amestec. Cel mai notabil experiment de centrifugare izopicnică este cel efectuat în 1958 de Meselson și Stahl prin care aceștia au demonstrat că replicarea ADN se realizează după modelul semiconservativ (Figura 22).

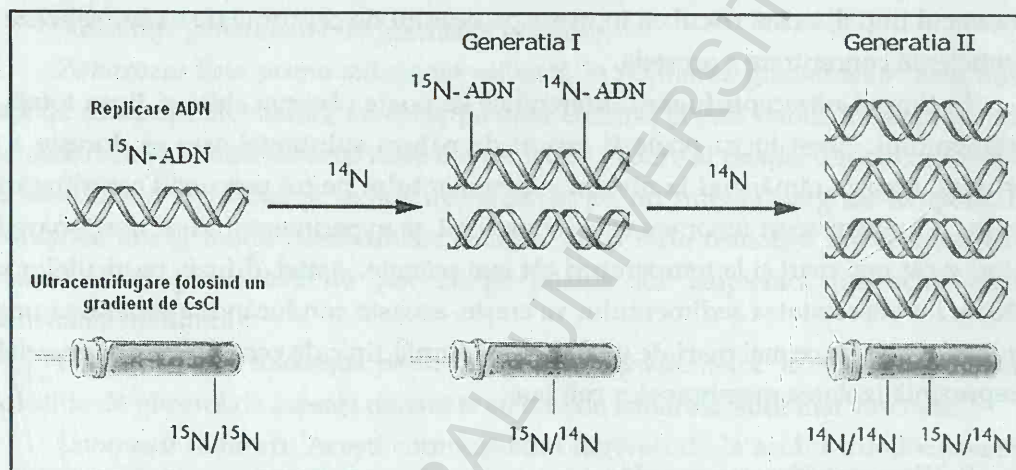


Figura 22. Experimentul lui Meselson și Stahl care a stat la baza descoperirii modelului semiconservativ de replicare al ADN.

Cei doi cercetători au crescut culturi bacteriene pe un mediu care conținea izotopul greu al azotului ^{15}N . Moleculele de ADN izolate de la acestea erau „grele” și se poziționau în partea inferioară a tubului în urma ultracentrifugării în gradient de clorură de cesiu. Dacă bacteriile conținând „ADN greu” erau transferate pe un alt mediu de creștere care conținea izotopul ușor ^{14}N , în prima generație, la ultracentrifugare, se obținea o singură bandă de ADN dar poziționată mai aproape partea superioară a tubului. La a doua generație se obțineau două benzi corespunzătoare moleculelor de ADN, una poziționată similar cu cea din prima generație, iar cealaltă și mai apropiată de partea superioară a tubului. Rezultatele sunt datorate modelului semiconservativ de replicare al ADN în care una dintre catenele vechi servește drept tipar pentru sinteza unei catene noi cu care apoi se împerechează pe bază de complementaritate pentru a forma o nouă moleculă dublucatenară.

Ultracentrifugarea izopicnică în gradient de clorură de cesiu este utilizată cu succes la izolarea ADN. Densitatea diferitelor tipuri de ADN este aproximativ aceeași cu cea a clorurii de cesiu la o concentrație de 6M (între 1,6 și 1,8 g/mL). Ultracentrifugarea soluției de clorură de cesiu la viteze foarte mari (la care forța centrifugă devine de 10^5 ori mai puternică decât gravitația) duce la formarea unui gradient de densitate la nivelul acesteia. Gradientul este de fapt rezultatul echilibrului stabilit între procesul de sedimentare a ionilor, orientat către partea inferioară a tubului, și procesul de difuzie al acestora, orientat către partea superioară a tubului, acolo unde concentrația lor este mai scăzută. Dacă ADN este plasat și ultracentrifugat în această soluție, el se va dispune la nivelul poziției de echilibru la un gradient echivalent cu densitatea sa de plutire.

Metoda este excelentă pentru realizarea purificării ADN dintr-un amestec care mai conține proteine și ARN. Densitatea de plutire a ADN este de aproximativ 1,7 g/cm³, în timp ce densitatea ARN este de 1,8 g/cm³, iar cea a proteinelor de 1,3 g/cm³. Astfel, în soluția de clorură de cesiu având o densitate de aproximativ egală cu cea a ADN, acesta se va poziționa sub forma unei benzi aproape de centrul tubului, ARN va forma o bandă la extremitatea inferioară a tubului, iar proteinele vor rămâne aproape de partea superioară a acestuia (Figura 23).

După încheierea ultracentrifugării, benzile sau regiunile separate care conțin particulele de interes, pot fi recoltate prin diverse metode:

- i. recoltare pe la partea inferioară a tubului, prin înțeparea acestuia;
- ii. recoltarea pe la partea superioară a tubului;
- iii. înlocuirea ascendentă a gradientului. Înlocuirea se realizează cu o soluție mai densă decât gradientul sau cu un lichid organic foarte dens dar inert. Mediul de înlocuire este introdus pe la partea superioară a tubului de centrifugă cu un ac care trebuie să ajungă la baza tubului. Colectarea conținutului tubului se face pe la partea superioară, manual sau cu un colector de fracții. Pentru fracțiile de ADN se înțeapă tubul cu un ac de seringă și apoi se extrage cât mai mult din fracția separată, sub iluminare UV dacă în soluție s-a introdus și bromură de etidiu.

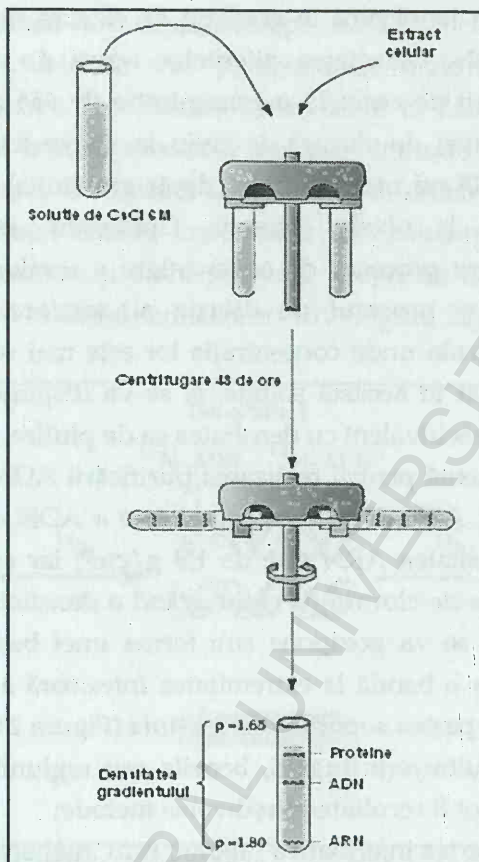


Figura 23. Separarea acizilor nucleici folosind tehnica ultracentrifugării izopicnice în gradient de clorură de cesiu (după Garrett și Grisham, Biochemistry, 2005).

Analiza gradientului se poate realiza prin diferite tehnici printre care menționăm monitorizarea continuă a absorbției la nivelul fracțiilor colectate.

1.5 Tehnici electroforetice de separare și analiză a acizilor nucleici

Metodele electroforetice de separare și analiză au o arie largă de utilizare în domeniul științelor biologice. Diversitatea și rezoluția acestor tehnici a favorizat folosirea lor în studiul componentelor celulare. Electroforeza a devenit o tehnică indispensabilă pentru studiile de biochimie, biologie și genetică moleculară, fiind frecvent utilizată pentru separarea și evidențierea polimorfismului proteinelor și/sau acizilor nucleici.

Electroforeza permite o separare a moleculelor pe baza unor proprietăți fizice, în acest caz sarcina electrică și masa moleculară. Principiul constă în dispunerea soluției care conține moleculele de separat pe un gel preparat în soluție apoasă și aplicarea unei diferențe de potențial între anod și catod. Ionii pozitivi se vor deplasa către catod iar ionii negativi către anod, moleculele neutre nefiind supuse deplasării. Această tehnică este cu atât mai importantă cu cât asigură realizarea de separări foarte fine ale diferitelor molecule și este destul de ușor de realizat practic.

Un ion de sarcină q dispus într-un câmp electric este supus unei forțe de migrare F a cărei valoare este dată de ecuația:

$$F = Eq / d,$$

unde E este voltajul și d este distanța dintre cei doi electrozi.

Dacă migrarea are loc într-o soluție tampon, moleculele încărcate electric vor fi supuse, pe lângă forța de migrare, și unei forțe de frecare direct proporțională cu mărimea lor, vâscozitatea soluției și viteza cu care ele se deplasează. Ca urmare, putem afirma că viteza de migrare a unei molecule încărcate electric este direct proporțională cu sarcina și voltajul aplicat și invers proporțională cu mărimea ei, vâscozitatea soluției și distanța dintre cei doi electrozi.

În general, voltajul aplicat la electroforeză generează un câmp electric a cărei valoare depinde de diferența de potențial aplicată și de lungimea gelului. Viteza de migrare este limitată de forțele de frecare care apar între moleculele de separat și gelul în care se realizează separarea efectivă.

În general, mediul de migrare pentru electroforeză este constituit dintr-un gel apos (agaroză, poliacrilamidă, amidon) turnat pe o placă orizontală sau între două plăci de sticlă dispuse vertical. Capetele gelului vin în contact cu soluția tampon conductoare care face legătura între cei doi electrozi. Eșantioanele de separat sunt aplicate într-o serie de godeuri dispuse în gel și sunt combinate cu un colorant ale cărui proprietăți sunt astfel alese încât să migreze mai rapid decât componentele amestecului pentru a permite supravegherea avansării moleculelor de separat care sunt, în general, invizibile în această etapă. Fiecare moleculă separată va apărea sub forma unei benzi perpendiculare pe direcția de migrare, a cărei grosime depinde de concentrație (Figura 24). Evidențierea moleculelor se face folosind diverse metode care vor fi prezentate în continuare.

Factorii care influențează procesul de electroforeză

1. Mobilitatea electroforetică. Poate fi definită ca distanța pe care o parcurge o particulă încărcată electric, plasată într-un câmp electric unitar, în unitatea de timp. Noțiunea de mobilitate electroforetică poate fi folosită doar pentru particulele de mărime mică. Mobilitatea electroforetică a particulei este direct proporțională cu sarcina efectivă și invers proporțională cu mărimea. Mobilitatea electroforetică este influențată de caracteristicile mediului.

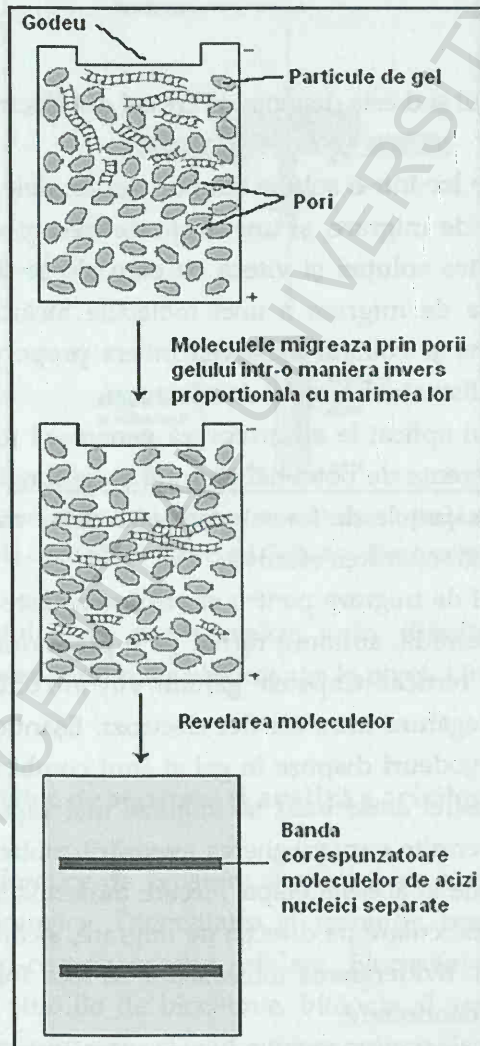


Figura 24. Reprezentarea schematică a procesului de electroforeză a acizilor nucleici.

2. Temperatura. Datorită intensității curentului electric, suportul de migrare se încălzește, iar producerea inegală de căldură determină diferențe de densitate la nivelul tamponului de electroforeză. Aceasta va conduce la crearea curenților de convecție. De aceea, se impune suprimarea lor prin folosirea de obicei a unor suporturi de migrare solide cât mai omogene.

Pe lângă curenții de convecție, degajarea de căldură implică și o deplasare a apei prin evaporare, riscându-se chiar modificări ale valorilor de pH, tăriei ionice, respectiv a conductibilității tamponului de electroforeză. De aceea, este recomandată răcirea mediilor în care se desfășoară experiențele electroforetice și limitarea intensităților curenților electrici aplicați.

Temperatura ideală de realizare a electroforezei este de 4°C. În aceste condiții densitatea apei este maximă, variația densității cu temperatura este neglijabilă și se elimină efectele curenților de convecție. În situația când temperatura depășește valorile normale, benzile substanțelor de migrare sunt curbate la marginea gelului și trebuie aplicat un sistem de răcire în timpul migrării.

3. Electroosmoza. Prin termenul de electroosmoză sunt desemnate toate fenomenele de mișcare ale apei datorate acțiunii câmpului electric. În soluție, ionii sunt puternic hidratați, fiind înconjurați permanent de un strat de molecule de apă care se schimbă continuu cu cele din mediul ambiant. Deplasările ionice în cursul procesului electroforetic antrenează deci deplasări ale apei către catod pentru cationi și către anod pentru anioni.

4. Valoarea de pH a mediului. La pH alcalin sau neutru, moleculele acizilor nucleici au sarcina electrică globală negativă. Ca urmare, este extrem de importantă monitorizarea valorii de pH a tamponului de migrare.

5. Tăria ionică. Viteza de migrare a moleculelor este diferită în funcție de tăria ionică. Astfel, în cazul folosirii unor tamponuri cu tărie ionică mică migrarea va fi rapidă, pe când cele care au tărie ionică mare permit obținerea unor zone de migrare mai înguste.

Tipuri de suporturi pentru electroforeza acizilor nucleici

Cea mai mare parte a electroforezelor se realizează pe suporturi care pot fi reprezentate ca niște rețele tridimensionale de fibre, repartizate mai mult sau mai puțin regulat. Rolul principal al suportului este de a conține mediul lichid în care se derulează procesul de separare electroforetică.

1. Agarul și agaroză.

Agarul este un constituent al peretelui celular și al matricei intercelulare al unor specii de alge marine. Produsul extras de aici este un amestec de polizaharide

compuse în principal dintr-un polimer alcătuit din unități dizaharidice (agarobioza). Îndepărtarea din structura agarului a grupărilor ionizabile prin cromatografie de schimb ionic conduce la obținerea agarozei.

2. Poliacrilamida.

Formează un gel cu proprietăți optime de separare electroforetică, stabil, transparent și flexibil. Acest gel se obține prin polimerizarea acrilamidei în prezența N,N'-metilen-bisacrilamidei (agent de reticulare), a N,N,N',N'- tetrametil-etilendiaminei (TEMED) și a persulfatului de amoniu drept catalizator. Practic, gelul de poliacrilamidă poate fi considerat o "sită moleculară" în care mărimea porilor depinde de concentrațiile inițiale ale monomerilor și de condițiile în care se desfășoară reacția de polimerizare (Figura 25).

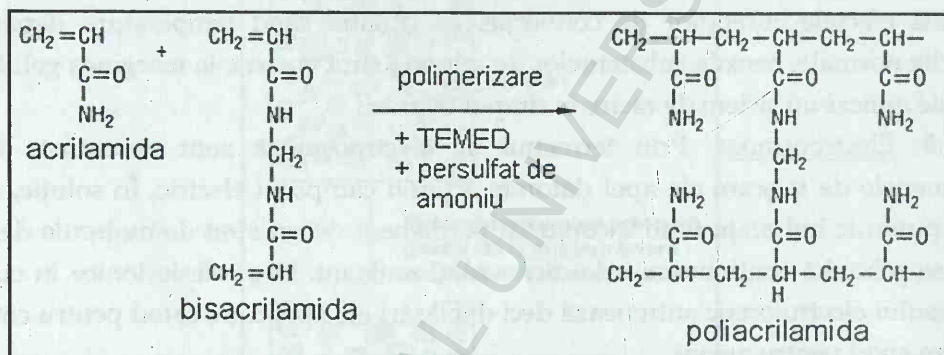


Figura 25. Reacția de polimerizare a acrilamidei (obținerea gelului înrețelat de poliacrilamidă).

Un gel de poliacrilamidă este caracterizat prin doi parametri: T (concentrația totală de monomeri) și C (gradul de reticulare). Se consideră că gelurile de poliacrilamidă sunt constituite dintr-o plasă formată din lanțuri lungi, care sunt din loc în loc legate prin intermediul agentului de înrețelare.

1.5.1 Electroforeza ADN în gel de poliacrilamidă (PAGE - Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

Spre deosebire de proteine, toți acizii nucleici, indiferent de lungimea lor, au densitate de sarcină negativă constantă. Cu cât greutatea moleculară a ADN sau ARN este mai mare, cu atât este mai lentă migrarea lor.

Acest tip de electroforeză este utilizată în vederea separării moleculelor de ADN care prezintă diferențe mici de mărime (chiar și un singur nucleotid), ea

prezentând o rezoluție mult mai bună decât agaroză. Colorarea gelurilor pentru vizualizarea ADN se face utilizând azotatul de argint, bromura de etidiu sau fluorocromi de generație nouă cum ar fi de exemplu *SYBR Green* sau *SYBR Green Gold* (Figura 26).

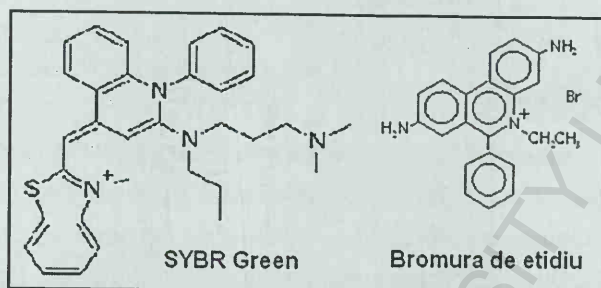


Figura 26. Structurile chimice ale agenților intercalanți *SYBR Green* și bromură de etidiu.

Atât bromura de etidiu, cât și *SYBR Green* sunt agenți intercalanți care se inseră la nivelul moleculelor de ADN permițând ulterior vizualizarea acestora (Figura 27). De exemplu, bromura de etidiu se inseră între planurile formate de bazele azotate la nivelul macromoleculei de ADN. Prin excitarea ei în lumina UV ($\lambda = 250-310$ nm) se obține o emisie în domeniul vizibil, la 520 nm (culoare roz-portocalie).

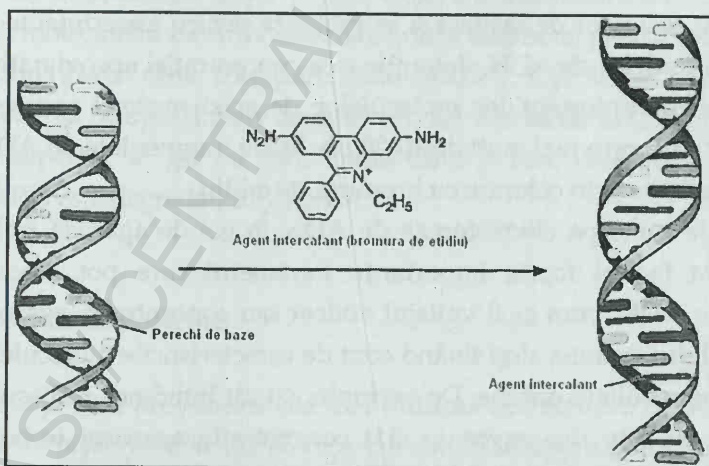


Figura 27. Modul de inserare la nivelul ADN al agenților intercalanți.

Sensibilitatea separării electroforetice în poliacrilamidă provine din faptul că pot fi separate molecule de ADN sau ARN a căror secvență diferă numai printr-un singur nucleotid (Figura 28). Aceasta proprietate a stat la originea migrării produselor

de secvențializare ADN. De asemenea, prin acest tip de electroforeză poate fi analizată conformația moleculelor de ADN, putând fi identificate conformațiile circular închise sau liniare.

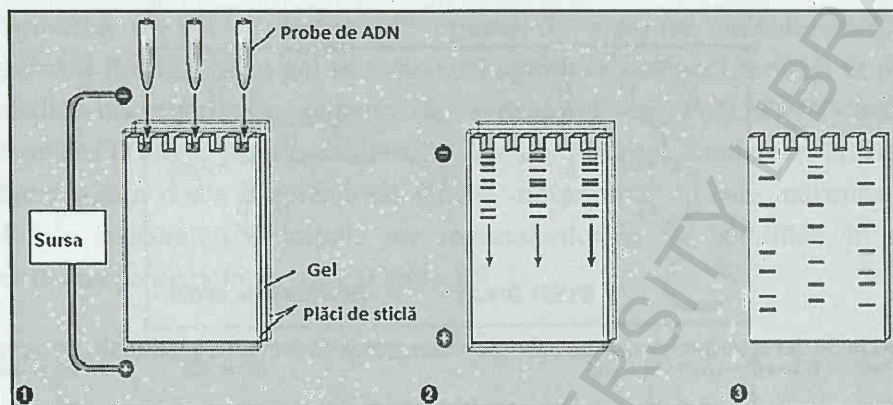


Figura 28. Electroforeza ADN în gel de poliacrilamidă (după Lehninger et al., Principles of Biochemistry, 2004).

I.5.2 Electroforeza ADN în gel de agaroză

Este mult mai ușor de realizat și se pretează pentru experimente ca verificarea integrității moleculelor de ADN, determinarea concentrației aproximative a soluțiilor de ADN, analiza conformațiilor moleculelor de acizi nucleici sau separarea unor produși care diferă prin mai mult de 10-20 pb. Toate fragmentele de ADN separate în gel pot fi vizualizate prin colorare cu bromură de etidiu.

Înainte de a începe electroforeza de ADN în gel de agaroză trebuie să ținem cont de câțiva factori foarte importanți. Parametrii care pot afecta mobilitatea moleculelor de ADN, cum ar fi voltajul aplicat sau concentrația agarozei folosite la prepararea gelului, trebuie aleși ținând cont de caracteristicile moleculelor de separat pentru a obține rezultate optime. De exemplu, cu cât lungimea moleculelor de ADN migrate prin gel este mai mare cu atât concentrația agarozei trebuie să fie mai scăzută.

Astfel, pentru molecule de ADN cu mărimi cuprinse între 2 și 60 Kpb se folosește agaroză având concentrații cuprinse între 0,5 și 1,5%. În cazul fragmentelor cu mărimi mai mici de 1 Kpb concentrația agarozei utilizate poate crește până la 4%. Totodată, reactivi precum standardele de masă moleculară (migrate împreună cu

probele ne ajută să estimăm cât mai precis mărimea moleculelor separate) sau markerii de migrare (diferiți coloranți, cum este de exemplu albastrul de bromfenol, care migrează prin gel împreună cu probele și ne permit monitorizarea procesului de electroforeză) trebuie selectați tot în funcție de mărimea și tipul moleculelor de separat.

1.5.3 Electroforeza ARN în gel de agaroză

Electroforeza în gel de agaroză constituie o metodă standard pentru separarea și identificarea moleculelor de ARN. Spre deosebire de ADN, moleculele de ARN prezintă un procent crescut de structuri secundare la nivelul conformației, fapt care impune folosirea unui gel denaturant pentru evidențiere. Formaldehida, agent chimic denaturant, asigură distrugerea structurilor secundare astfel încât migrarea moleculelor de ARN se realizează efectiv doar pe baza sarcinii și masei moleculare a acestora. Acest tip de electroforeză asigură doar separarea și evidențierea moleculelor mari de ARN (ex. ARN ribozomal). Vizualizarea ARN se realizează utilizând tot bromura de etidiu.

Electroforeza în gel de agaroză este utilizată cu succes pentru evaluarea integrității ARN total extras din diferite probe biologice. Stabilitatea moleculelor de ARN este mult mai scăzută în comparație cu ADN. Procesul degradării acestora este mult mai frecvent și reprezintă un impediment major pentru experimentele ulterioare. De exemplu, în cazul separării moleculelor de ARN ribozomal de la eucariote, pentru probele întregi se vor observa două benzi clare, corespunzătoare ARNr 28S și ARNr 18S. Banda pentru ARNr 28S trebuie să fie aproximativ de două ori mai intensă decât cea pentru ARNr 18S. Dacă benzile separate în gel nu sunt foarte clare și bine delimitate se poate trage concluzia că ARN este degradat/fragmentat.

1.5.4 Electroforeza de proteine

În cazul separării proteinelor cea mai utilizată este tehnica SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis*). În soluție, sarcina electrică totală a proteinelor depinde de valoarea de pH a mediului și de compoziția în aminoacizi a acestora. Drept urmare, fiecare proteină prezintă un punct izoelectric reprezentat de o anumită valoare de pH la care suma sarcinilor pozitive și negative este zero. Sub această valoare ea va fi încărcată negativ și ca urmare va migra către anod. În caz contrar, la valori de pH mai mari decât cea a punctului izoelectric, proteinele vor

căpăta încărcare pozitivă și vor migra în câmp electric către catod. Ca atare, deplasarea proteinelor în câmp electric depinde de încărcarea lor, dar și de masa moleculară.

Sodiu dodecil sulfatul este un detergent anionic care interacționează cu proteinele prin legarea la lanțul polipeptidic. Această legare generează o sarcină totală negativă pentru proteine, sarcină distribuită proporțional pe toată lungimea moleculelor, astfel încât tratamentul cu acest compus va conduce la obținerea unei sarcini totale negative pentru acestea (Figura 29).

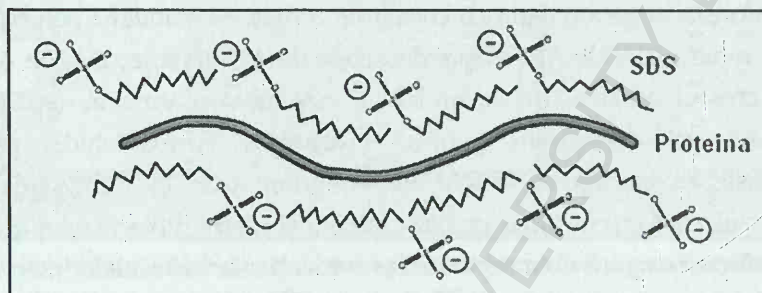


Figura 29. Moleculele de SDS se leagă la lanțul polipeptidic conferindu-i acestuia o sarcină globală negativă.

Adăugarea de 2-mercaptoetanol sau ditiotreitol conduce la înlăturarea punților disulfurice din structura proteinelor și conferă o conformație *random-coil* acestora, conformație necesară pentru a permite separarea lor pe baza masei moleculare. În concluzie, în tehnica SDS-PAGE, separarea proteinelor se va face numai pe baza masei lor moleculare, iar sarcina electrică globală nu va avea nicio contribuție în migrarea acestora.

I.6 Tehnici derivate de la metodele electroforetice de separare a acizilor nucleici

I.6.1 SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphism*) - Polimorfismul conformațional al monocatenelor

Detectarea diferențelor care pot apărea la nivelul secvențelor ADN este extrem de importantă nu numai pentru a pune în evidență procesele mutaționale, ci și pentru a putea identifica polimorfismele de la nivelul dublei catene. Tehnica SSCP este una dintre cele mai utilizate metode pentru detectarea polimorfismelor ADN, cu ajutorul ei putându-se pune în evidență diferențele de conformație care apar la nivelul dublului helix.

Polimorfismul conformațional al monocatenelor este definit ca fiind o diferență de conformație care apare între două monocatene având lungimi identice și care este datorată modificărilor care apar la nivelul compoziției în nucleotide. Această caracteristică a acizilor nucleici ne permite diferențierea între două monocatene a căror compoziție diferă prin una sau mai multe nucleotide, în anumite condiții experimentale, utilizând electroforeza în gel de poliacrilamidă.

Deci, tehnica este bazată pe comportamentul electroforetic diferit al unor fragmente monocatenare de ADN în gel de poliacrilamidă nendenaturant. O moleculă de acid nucleic monocatenar poate forma structuri secundare determinate de împerecherile de baze din interiorul moleculei. Aceste structuri depind de secvența monocatenei și conferă o conformație particulară fiecărui tip de moleculă. Ca atare, două secvențe de ADN aproape identice se pot diferenția pe baza conformației monocatenare pe care o adoptă. Se poate ajunge până la detectarea unei mutații punctiforme de la nivelul unui fragment de acid nucleic.

Tehnica prezintă un inconvenient major, deoarece comportamentul electroforetic al fragmentelor monocatenare este imprevizibil și depinde foarte mult de reproductibilitatea condițiilor electroforetice și de mărimea lor.

În practică, se realizează inițial o reacție PCR (*Polymerase Chain Reaction*) prin care este amplificat fragmentul de interes. Ulterior, acesta este denaturat la 95°C și răcit rapid pe gheață. În acest fel, monocatenele nu mai au timp să reformeze structura de duplex, dar fiecare formează câte o structură secundară a cărei conformație este dependentă de conținutul și secvența nucleotidelor din structura lor. Aceste fragmente sunt separate prin electroforeză nendenaturantă în gel de poliacrilamidă (Figura 30). Pentru un individ homozigot se obțin, în general, două benzi foarte apropiate pe gel, deoarece cele două molecule de ADN monocatenare, chiar cu structură identică pot avea conformații ușor diferite. Acest comportament este posibil datorită mai multor conformații semistabile pentru aceeași catenă. Pentru un individ heterozigot se vor observa patru benzi grupate două câte două.

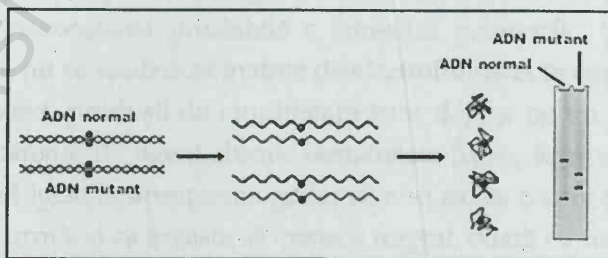


Figura 30. Reprezentarea schematică a tehnicii SSCP.

Metoda este foarte simplă și destul de sensibilă, constituind o tehnică ușor de aplicat în vederea evidențierii variațiilor punctiforme de secvență dintr-o regiune amplificabilă prin PCR.

Într-o altă variantă a tehnicii (analiza de heteroduplexuri), doi ampliconi PCR, în cantități egale, sunt amestecați într-o soluție tampon nedenantantă. Ulterior, moleculele de ADN sunt încălzite la 95°C și apoi răcite treptat. Astfel, în timpul procesului de răcire catenele complementare și necomplementare (la nivelul acestora există mutații punctiforme sau alte diferențe) se regroupează formând homo-, respectiv heteroduplexuri. Deosebirile care apar la nivelul heteroduplexurilor se reflectă în modificări de conformație sau de flexibilitate față de homoduplexuri, care conduc la diferențe de mobilitate în timpul migrării prin gelul de poliacrilamidă.

Factorii limitanți ai tehnicii SSCP sunt reprezentați de mărimea fragmentelor de ADN analizate și de conținutul în GC al acestora. Astfel, analizele SSCP funcționează optim pentru monocatene de până la 300 de nucleotide, iar analiza de heteroduplexuri pentru fragmente cuprinse între 200 și 600 nucleotide. De asemenea, tehnica SSCP este eficientă atunci când analizăm fragmente de ADN cu un conținut ridicat de guanină și citozină. Dacă acest conținut este mai scăzut se recomandă optimizarea protocoalele prin răcirea sistemului de electroforeză și a gelului la 4°C. În schimb, analiza de heteroduplexuri este optimă atunci când conținutul în GC al fragmentelor de analizat este mai scăzut.

Detectarea diferențelor mici (ex. mutații punctiforme) de la nivelul secvențelor de acizi nucleici se poate realiza folosind CE-SSCP (*Capillary Electrophoresis-SSCP*). Diferența în acest caz este dată de realizarea amplificării prin utilizarea unor primeri sens și antisens marcați fluorescent utilizând fluorocromi diferiți. Ampliconul rezultat, care conține mutația de interes, este denaturat și supus unei electroforeze capilare în gel nedenantant (Figura 31) astfel încât să fie asigurată migrarea catenelor numai în funcție de mobilitate acestora (datorată secvenței lor nucleotidice).

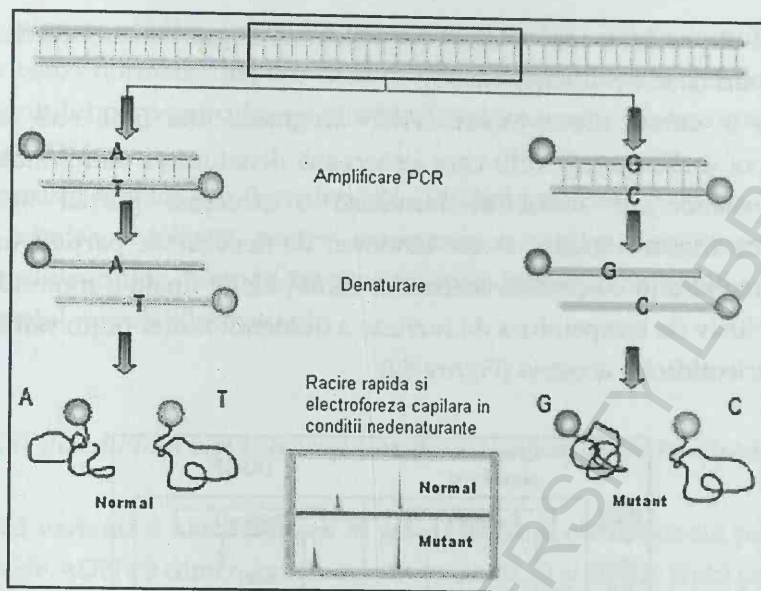


Figura 31. Detectarea mutațiilor punctiforme utilizând tehnica CE-SSCP.

La ora actuală, tehnica SSCP este utilizată pentru evidențierea polimorfismelor de la nivelul ADN și poate fi considerată complementară tehnicii de secvențializare. Tehnica poate fi utilizată și ca metodă de diagnostic datorită costurilor scăzute, ea putând diferenția indivizii homozigoți de cei heterozigoți, pentru o mutație cunoscută.

I.6.2 DGGE (Denaturing Gel Gradient Electrophoresis) – Electroforeza în gradient de gel denaturant

Tehnica permite identificarea unor polimorfisme și mutații la nivelul ADN și ARN. DGGE face posibilă diferențierea unor molecule de ADN care diferă printr-un singur nucleotid și este aplicabilă fragmentelor care conțin mai multe sute de baze, nefiind necesară cunoașterea prealabilă a situsului polimorfic. Spre deosebire de SSCP, denaturarea nu se realizează înainte de electroforeză ci în cursul acesteia.

În acest context, produșii de amplificare sunt depuși pe un gel care conține o concentrație crescătoare de agent chimic denaturant (uree, formamidă). Gradientul este preparat astfel încât în apropierea godeurilor să existe o concentrație scăzută de agent denaturant urmând ca aceasta să crească treptat, odată cu mărirea distanței de migrare. Există și o altă variantă a tehnicii, care folosește pentru denaturare o

temperatură din ce în ce mai crescută pe parcursul migrării electroforetice (TGGE - *Temperature Gel Gradient Electrophoresis*).

Astfel, în cursul electroforezei, ADN migrează mai întâi sub formă dublu catenară, apoi întâlnește condiții care generează denaturarea astfel încât domeniile mai puțin stabile ale moleculei formează o structură parțial monocatenară, ramificată, cu forma literei Y. Acest fenomen de denaturare parțială antrenează o reducere a mobilității electroforetice, astfel încât poziția finală a moleculei în gel va depinde exclusiv de temperatura de fuziune a domeniilor mai puțin stabile și deci de secvența nucleotidică a acestora (Figura 32).

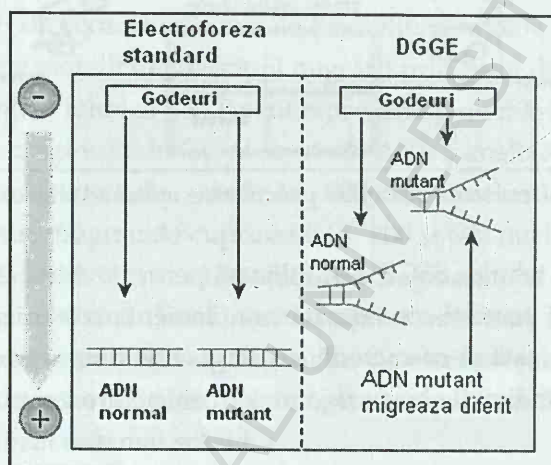


Figura 32. Electroforeza în gradient de gel denaturant (după Clark D., Molecular Biology, 2005).

Modul și timpul în care se realizează denaturarea vor depinde direct de succesiunea de nucleotide din molecula de ADN. Dacă regiunea analizată nu conține un "domeniu de topire" bine individualizat, metoda poate fi sensibilizată prin adăugarea unei secvențe GC la extremitatea 5' a unuia dintre primeri. Acesta va genera o secvență GC dublucatenară (*GC clamp*) la nivelul produsului obținut prin amplificare PCR. Temperatura de topire a acestei zone va contrasta cu cea a secvenței adiacente. În final, moleculele de ADN cu secvențe diferite vor denatura la distanțe și momente de timp diferite în gelul de poliacrilamidă, făcând posibilă separarea acestora.

În practică se folosește o combinație de temperaturi relativ crescute (cuprinse între 50 și 60°C) și agenți chimici denaturanți pentru a obține o separare extrem de eficientă. Ca agenți chimici denaturanți se utilizează cel mai frecvent combinații de uree și formamidă. Gradientul chimic poate fi dispus paralel sau perpendicular pe

direcția de migrare a ADN. În condițiile unui gradient paralel cu frontul de migrare vor rezulta benzi normale, dispuse ca la o electroforeză tipică în gel de agaroză. În cazul gradientului perpendicular pe direcția de migrare se vor forma o serie de benzi sigmoide de ADN.

Prin această tehnică pot fi evidențiați indivizii heterozigoții și homozigoții. De asemenea, tehnica e folosită pentru detectarea mutațiilor punctiforme, dar și a delețiilor sau inserțiilor. Metoda își găsește aplicabilitate și în analiza variabilității genice la nivelul populațiilor naturale.

1.6.3 PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) – Electroforeza în câmp pulsatoriu

Această variantă a electroforezei în gel de agaroză este utilizată pentru analiza moleculelor de ADN cu dimensiuni foarte mari (între 10 și 10.000 Kpb) și folosește un câmp electric pulsatoriu obținut cu ajutorul unui aranjament poligonal al electrozilor. Cu ajutorul acestei tehnici pot fi separate și analizate molecule extrem de mari de ADN, chiar și cromozomi întregi.

Principiul tehnicii PFGE este același ca al electroforezei în gel de agaroză. Diferența apare atunci când curentul electric aplicat pentru migrarea probelor nu este orientat paralel cu frontul de migrare ci se folosesc două câmpuri electrice care sunt dispuse într-un anumit unghi unul față de celălalt. Câmpurile electrice alternează pulsatoriu, între cele două seturi de electrozi (Figura 33).

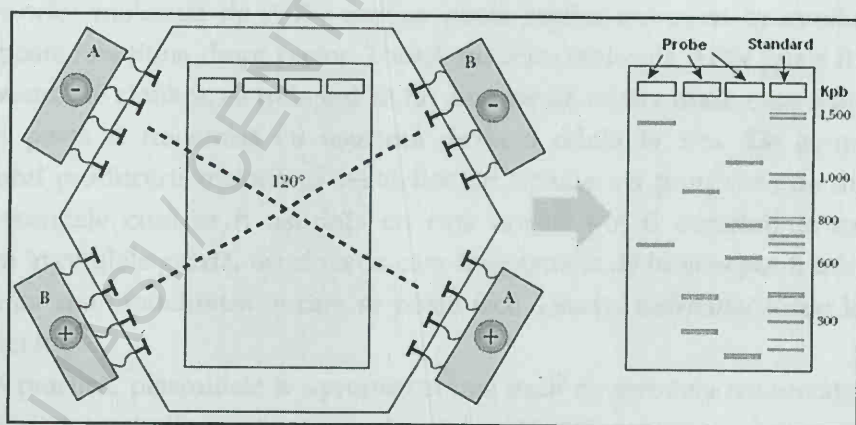


Figura 33. Electroforeza în câmp pulsatoriu (după Clark D., Molecular Biology, 2005).

Astfel, moleculele de ADN părăsesc godeurile și migrează alternativ către unul dintre cei doi electrozi pozitivi. Prin alternanța constantă a câmpurilor electrice moleculele vor migra relativ repede în gelul de agaroză și se vor separa în funcție de mărime. În final gelul este colorat cu bromură de etidiu și benzile separate pot fi vizualizate în lumină UV.

CAPITOLUL II

TEHNOLOGIA ADN RECOMBINANT. CLONAREA MOLECULARĂ

II.1 Instrumente moleculare utilizate în obținerea ADN recombinant

Tehnologia de obținere a ADN recombinant este reprezentată de o întreagă gamă de metode moleculare cu ajutorul cărora se pot realiza în condiții de laborator molecule de ADN recombinante. Tehnologia servește la clonarea și multiplicarea unor fragmente de ADN sau a unor gene întregi de diverse origini, atât în celulele procariote, cât și în cele eucariote.

În general, tehnica clonării moleculare constă în inserarea unui fragment de ADN la nivelul unei alte molecule de ADN reprezentată de obicei de un vector de tip plasmidial, cosmidă, YAC, BAC etc. După clonare, molecula obținută (reprezentată de molecula de ADN introdusă în vectorul de clonare) va fi introdusă într-o celulă gazdă pentru a putea fi multiplicată și ulterior analizată.

II.1.1 Vectori de clonare

Pentru manipularea moleculelor de ADN exogen de interes în vederea clonării și multiplicării lor este necesar un vector de clonare. Vectorii reprezintă molecule de ADN în interiorul cărora se pot introduce fragmentele nucleotidice. În principiu, absolut orice moleculă de ADN care se poate replica autonom în interiorul unei celule poate funcționa drept vector. Totuși, nu orice moleculă ADN poate fi utilizată drept vector de clonare, ea trebuind să fie o moleculă relativ mică, ușor manevrabilă care să poată fi transmisă cu ușurință de la o celulă la alta. De asemenea, în momentul producerii majorității vectorilor de clonare s-a ținut cont de mai multe reguli esențiale cum ar fi ușurința cu care aceștia pot fi detectați în momentul inserării în celulele gazdă, ușurința cu care fragmentele de interes pot fi introduse la nivelul lor sau modalitatea în care se poate face detecția moleculei insert la nivelul secvenței lor.

În practică, plasmidele se apropie cel mai mult de cerințele enumerate mai sus iar vectorii derivați din acestea sunt cel mai des utilizați.

Conform lui Vassu et al., 2001, vectorii de clonare pot fi clasificați după mai multe criterii:

i. după posibilitatea studierii exprimării fragmentelor de ADN exogen există: vectori de clonare (nu au în structură secvențe de tip promotor și, ca atare, nu permit analiza exprimării insertului, ci doar clonarea lui) și vectori de exprimare (au în structură și secvențe promotor).

ii. după tehnica de clonare folosită există: vectori de clonare inserțională (prezintă un situs unic de restricție) și vectori de clonare prin înlocuire (insertul înlocuiește un fragment din vector).

iii. după structura și modul de funcționare avem: vectori plasmidiali (derivați din structura plasmidelor), virali (derivați din structura genoamelor virale) sau hibrizi (fagimide – au o structură hibridă, de genom de fag filamentos și de plasmidă sau cosmide – au de asemenea structură hibridă de genom de fag Lambda și de plasmidă).

iv. după spectrul de gazdă avem: vectori congenerici (se folosesc doar la tulpini ale aceluiași gen taxonomic) și vectori *shuttle* sau navetă (pot fi utilizați în tulpini aparținând mai multor genuri).

Vectori folosiți la organisme procariote

Vectori de clonare plasmidiali

Plasmidele sunt reprezentate de molecule de ADN dublucatenare, circulare, caracteristice celulelor procariote. Ele reprezintă un material genetic extracromozomial și sunt capabile să se replice independent, putând fi transferate dintr-o celulă în alta. De obicei, plasmidele conțin gene care codifică proteine implicate în diverse activități metabolice, dar și în procesul de rezistență la diferite antibiotice. Genele conținute de plasmide sunt de cele mai multe ori esențiale celulelor bacteriene gazdă. Astfel, acestea sunt purtătoare de gene care codifică pentru proteine implicate în catabolismul unor substanțe organice atipice din mediul înconjurător, pentru rezistența la diferite metale grele sau proteine care degradează moleculele antibioticelor ori blochează acțiunea bacteriofagilor.

Plasmidele sunt molecule relativ mici, de circa 3 până la 10 Kpb. Ele sunt folosite în ingineria genetică, în acest caz fiind foarte mult modificate. La nivelul plasmidelor există o regiune *ori* (origine de replicare – permite replicarea autonomă în celula gazdă), una sau mai multe gene care conferă rezistență la antibiotice (acestea permițând selecția coloniilor bacteriene care au integrat plasmida) și un situs de policlonare. Situsul de policlonare (*Multiple Cloning Site* - MCS) sau situsul *polilinker* este de fapt o secvență de ADN care este constituită dintr-o succesiune de

situsuri de recunoaștere pentru enzime de restricție. Aceste situsuri sunt de obicei unice și sunt folosite pentru experimentele de clonare.

Conform lui Vassu et al., 2001, plasmidele necesită o serie de caracteristici pentru a putea fi folosite ca vectori de clonare:

- să nu conțină gene *tra* astfel încât ele să nu genereze procese de conjugare, pierzându-și astfel proprietatea de autotransmisibilitate.
- să conțină situsuri de recunoaștere unice pentru un număr de cât mai mare de endonucleaze de restricție.
- situsul de policlonare să nu fie poziționat într-o regiune cu gene esențiale.
- să prezinte markeri genetici specifici absenți în celula receptoare și cât mai multe copii în fiecare celulă.
- să aibă o greutate moleculară mică pentru a putea fi ușor de manipulat în experimentele ulterioare.

Prima plasmidă care a fost folosită în experimente de clonare a fost una naturală, și anume **ColE1** din *Escherichia coli*. Aceasta este reprezentată de o mică moleculă de ADN circulară, capabilă de autoreplicare și aflată într-un număr de până la 40 de copii în celulă. Mai apoi, a apărut ideea ca fragmentele de ADN exogen să fie inserate într-o plasmidă artificială, derivată din **ColE1** sau din alte plasmide naturale. Astfel s-a trecut la dezvoltarea unor plasmide artificiale în vederea folosirii lor ca vectori de clonare: pBR322, pUC18, pUC19, pGEM (Vassu et al., 2001).

Unul dintre cei mai des folosiți vectori de clonare a fost pBR322 (Figura 34). Acesta are o mărime de 4363 pb și conține gene care asigură rezistența la tetraciclină și ampicilină. Acestea servesc drept markeri de selecție pe parcursul procedurilor de clonare. De asemenea, vectorul conține și o regiune *ori* care îi permite replicarea autonomă în interiorul celulelor gazdă.

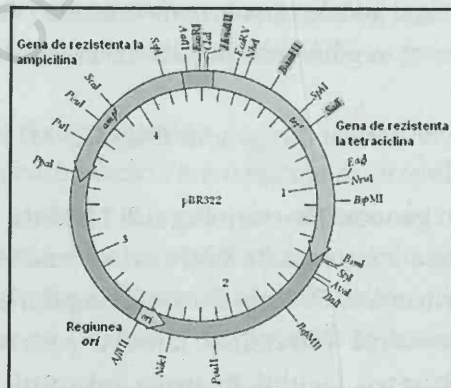


Figura 34. Vectorul de clonare plasmidial pBR322 (după Garrett și Grisham, Biochemistry, 2005).

Vectori de clonare derivați din bacteriofagii filamentoși

Unele virusuri bacteriene apar sub forma unui filament foarte subțire la nivelul celulei bacteriene. Un exemplu de astfel de virus este bacteriofagul M13, care are genomul reprezentat de o moleculă de ADN monocatenar, circular închisă, de 6,4 Kb mărime (Figura 35). Genomul conține 10 gene, dintre care cele mai importante sunt gena II (codifică o enzimă care facilitează replicarea) și gena III (codifică o proteină pilot implicată în direcționarea particulelor virale nou sintetizate).

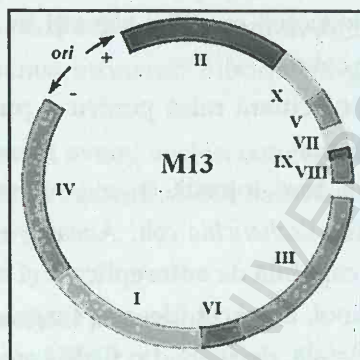


Figura 35. Genomul bacteriofagului M13.

În momentul pătrunderii în interiorul celulei bacteriene, ADN fagic generează ciclul de replicare cu ajutorul unei forme intermediare dublu catenare. Bacteriofagul M13 nu distruge celula gazdă ca urmare a eliberării noilor particule virale formate în interiorul acesteia. Genele acestui fag bacterian sunt în totalitate esențiale pentru activitatea virală astfel încât ele nu pot fi substituite în momentul manipulărilor necesare construcției vectorilor de clonare. Toți vectorii derivați din genomul fagului M13 posedă obligatoriu toate genele sălbatice ale acestuia (Vassu et al., 2001). Totuși, la nivelul genomului există regiuni neesențiale la nivelul cărora se poate realiza clonarea.

Un exemplu de vector derivat din genomul fagului M13 este M13 mp18/19.

Vectori derivați din genomul bacteriofagului Lambda

Bacteriofagul Lambda infectează în mod normal celulele de *Escherichia coli*, iar genomul acestuia are aproximativ 50 Kpb. Genomul fagului este reprezentat de ADN liniar, dublucatenar și prezintă extremități coezive (secvențe *cos*). Aceste capete coezive permit recircularizarea fagului în urma infectării, folosind echipamentul enzimatic al celulei gazdă. Genomul este constituit din trei regiuni: două regiuni

marginale care conțin gene esențiale pentru ciclul litic al fagului codificând proteine structurale sau implicate în replicare și o regiune de mijloc, de aproximativ 15 Kpb, neesențială (Figura 36). Această regiune poate fi substituită cu ADN exogen în cazul vectorilor derivați din fagul Lambda (Vassu et al., 2001).

În vederea infecției, particula fagică se fixează la exteriorul celulei bacteriene, eliberând ulterior genomul în interiorul acesteia. Mașinăria enzimatică a bacteriei va fi folosită atât pentru recircularizare, cât și pentru producerea proteinelor fagice. În final, genomul fagic se va replica într-un număr mare de copii și împreună cu proteinele nou sintetizate va forma virioni care vor fi eliberați în exterior prin liza celulei gazdă.

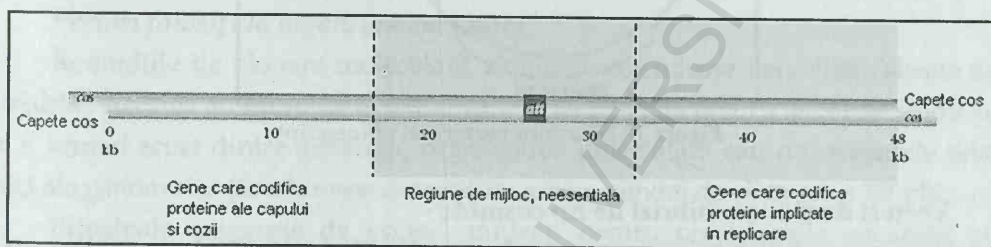


Figura 36. Organizarea pe regiuni a genomului bacteriofagului Lambda (după Clark D., Molecular Biology, 2005).

Genomul fagului Lambda are dimensiuni mari și prezintă multe situsuri pentru enzime de restricție la nivelul genelor esențiale pentru ciclul său de viață. De asemenea, în interiorul capului virionului nu pot încăpea molecule foarte mari de ADN care să fie și împachetate în mod corect. Ca atare, doar fragmentele mici pot fi introduse la nivelul vectorilor derivați din acesta. Cu toate acestea s-a reușit dezvoltarea unui număr mare de vectori cum ar fi Charon, EMBL4 sau DASH. Avantajul unui astfel de vector derivat din genomul fagic față de unul plasmidial este că el poate accepta fragmente mai mari de ADN exogen, de până la 20 Kpb.

Vectori de clonare de tip fagimide

Sunt vectori de clonare hibridi care combină caracterele de plasmide cu cele de fagi filamentoși. Mai concret, ei conțin o regiune *ori* (care asigură replicarea autonomă) și o genă de rezistență la antibiotice moștenite de la plasmide și regiunea intergenică din fagii filamentoși. Datorită acestei combinații, vectorii de tip fagimide pot fi propagați și menținuți sub formă de plasmidă în celulele gazdă.

Atunci când celulele sunt infectate cu un fag filamentos „helper” modul de replicare se va schimba sub acțiunea genelor fagice. În acești vectori pot fi introduse fragmente cu mărimea de maxim 10 Kpb (Vassu et al., 2001). Cei mai utilizați vectori de acest tip sunt pUC 118, pUC 119 și pBluescript (Figura 37).

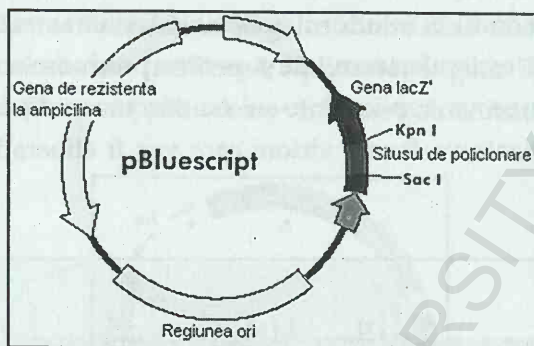


Figura 37. Structura vectorului pBluescript.

Vectori de clonare hibridi de tip cosmide

Sunt tot vectori hibridi care conțin în structura lor atât ADN plasmidial, cât și situsul *cos* din genomul fagului Lambda. Acesta permite împachetarea *in vitro* a vectorului și, implicit, propagarea sa prin transducție sau transfecție. Cosmidele propriu-zise sunt de fapt plasmide care conțin la nivelul lor secvența *cos*. La început, cosmidele sunt linearizate astfel încât au la capete secvențele *cos*. În momentul în care vectorul a primit ADN exogen în interiorul său, întregul construct poate fi împachetat și utilizat la infectarea celulelor gazdă. Acești vectori permit clonarea unor fragmente mari de ADN (până la 45 Kpb), permițând chiar propagarea unor gene eucariote întregi. Odată intrată în bacterie, cosmida se replică după modelul plasmidial, deoarece ea nu posedă genele necesare pentru producerea unor noi particule fagice (Vassu et al., 2001).

Cosmidele sunt utilizate la construirea de bănci de ADN genomic sau la clonarea și analiza unor regiuni de ADN din care fac parte din familii de gene. Câteva exemple de vectori de tip cosmide ar fi pJB8, c2RB sau pWE15.

Vectorii de clonare pentru molecule de ADN foarte mari

Vectorii care prezintă un număr mare de copii în celulă, cum ar fi vectorii derivați din plasmide, prezintă avantajul de a furniza mari cantități de ADN exogen față de vectorii care apar în copii unice. Cu toate acestea, ei prezintă dezavantajul că inserții de dimensiuni mari sunt instabili și pot fi pierduți din structură în urma unor

procese de recombinare. O alternativă pentru clonarea unor fragmente largi de ADN în bacterii o reprezintă cromozomii bacterieni artificiali sau **vectorii BAC** (*Bacterial Artificial Chromosome*). Vectorii BAC se comportă ca niște plasmide de mărimi mari, clonarea cu ajutorul acestora fiind mai eficace, iar clonele, mult mai stabile. Vectorii BAC sunt de fapt derivați din plasmida F de la *Escherichia coli* și pot accepta inserți de până la 300-400 Kpb.

Alți vectori de clonare utilizați pentru multiplicarea fragmentelor foarte mari de ADN eucariot sunt cei de tip **PAC** (*P1 Artificial Chromosome*). Aceștia sunt derivați din bacteriofagul P1, pot prelua inserți de până la 150 Kpb și au fost adaptați pentru a fi utilizați în celulele de *Escherichia coli*. Acești vectori hibridi de mărimi foarte mari pot fi introduși în celulele bacteriene numai prin tehnici speciale cum este electroporarea.

Vectori folosiți la organisme eucariote

În studiile de clonare moleculară singurele organisme eucariote folosite sunt drojdiile. Acestea au multiple avantaje care le recomandă pentru astfel de studii cum ar fi timpul scurt dintre generații, organizarea unicelulară sau dimensiunile relativ mici ale genomului (*Saccharomyces cerevisiae* are un genom de circa $1,4 \times 10^7$ pb).

Principala categorie de vectori utilizați pentru organismele eucariote sunt vectorii de secreție. Aceștia se folosesc la manipularea genetică a drojdiilor în vederea producerii de proteine care ulterior sunt secretate în mediul de cultură și recoltate.

Cercetările care vizează caracterizarea genoamelor întregi necesită folosirea unor vectori de clonare care să permită integrarea fragmentelor mari de ADN exogen. Spre exemplu, genele care provin de la organismele eucariote conțin atât secvențe codificatoare, cât și secvențe intronice, necodificatoare, având adesea mărimi foarte mari, de până la câteva sute de kilobaze.

Din acest motiv apare problema existenței unor vectori suficient de mari pentru clonarea unor astfel de gene. Vectorii derivați din plasmide sau bacteriofagi nu sunt suficient de mari pentru a permite inserarea, aceștia putând îngloba fragmente de maxim 100 Kpb. Ca atare, s-a trecut la construcția unor vectori speciali cum ar fi **YAC** (*Yeast Artificial Chromosome*) sau **BAC**. Ambele tipuri de vectori posedă capacitatea de a se multiplica în celulele de drojdii (Vassu et al., 2001).

Vectorii YAC sunt construiți pornind de la secvențe cromozomale de drojdii și se comportă ca un cromozom atunci când sunt introduși sub formă liniară în celule. Vectorii conțin și diferite gene de selecție care codifică pentru enzime care permit selecționarea drojdiilor care au integrat vectorul viabil.

În vectorii YAC pot fi introduse fragmente foarte mari de ADN exogen, de până la 2×10^6 pb. Pentru ca orice replicon să reziste în interiorul unei celule de drojdie el

trebuie să posede o origine de replicare specifică drojdiilor (secvența ARS) și o regiune centromerică de recunoaștere (Figura 38). Vectorii YAC posedă ambele tipuri de secvențe. Datorită prezenței originii de replicare ARS și a secvențelor centromerice, drojdiile tratează aceste structuri artificiale ca pe un cromozom, în final obținându-se o multiplicare consistentă a ADN exogen. Forma care se replică în interiorul celulelor de drojzii este forma liniară a vectorului (Vassu et al., 2001).

Vectori utilizați la deplasarea genelor între organisme diferite

În experimentele de clonare moleculară este uneori nevoie ca genele investigate să fie transferate de la un organism la altul. Acest proces se poate realiza numai dacă folosim vectorii de tip *shuttle* sau *navetă* care au capacitatea de a supraviețui și a se multiplica în mai multe tipuri de celule gazdă.

Primii vectori *navetă* au fost concepuți pentru a putea trece cu succes din celule procariote bacteriene în celule eucariote simple de drojzii. Aceștia au fost construiți pornind de la plasmidele bacteriene la care au fost adăugate câteva elemente noi (Vassu et al., 2001). Se cunoaște faptul că originile replicării (secvențele *ori*) de la procariote nu funcționează în celulele eucariote datorită mecanismului de replicare diferențiat al celor două tipuri de organisme.

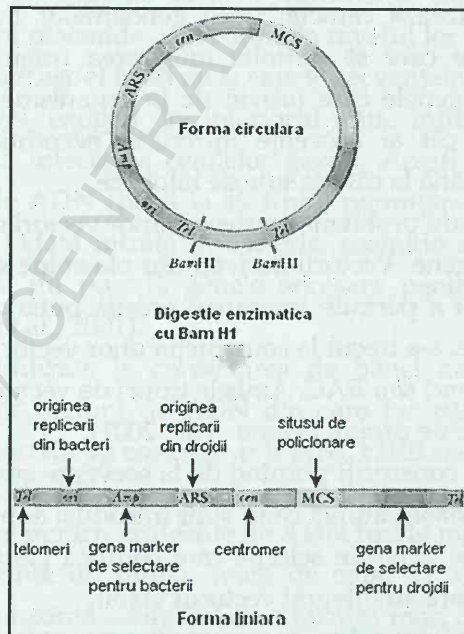


Figura 38. Formele circulară și liniară a unui vector YAC (după Clark D., Molecular Biology, 2005).

De aceea, vectorii navetă trebuie să conțină în structura lor atât secvențe *ori* cât și o origine de replicare funcțională în celulele drojdiilor (secvența *ARS*). Această secvență *ARS* este funcțională și în alte tipuri de celule eucariote, fapt care îmbunătățește mult calitățile vectorilor navetă. De asemenea, acești vectori trebuie să conțină în structura lor și o secvență centromerică care asigură partiția corectă a acestora în celulele drojdiilor.

În momentul în care celulele se divid, cromozomii duplicați în prealabil sunt fixați la nivelul centromerilor și trasi către polii celulari astfel încât să poată fi repartizați în mod corect între cele două celule fiice. Același lucru se întâmplă și cu vectorii navetă, care trebuie să segreghe corect în timpul diviziunii, deoarece conțin în structura lor secvența *Cen* provenită din cromozomii levurilor.

Un ultim element absolut necesar vectorilor navetă este o genă marker specifică pentru selecția celulelor de drojdie în care aceștia au pătruns. De cele mai multe ori se folosesc în practică tulpini de drojdii care prezintă un defect genetic indus, cum ar fi de exemplu incapacitatea de a produce un aminoacid. Gena care poate ajuta drojdia să producă aminoacidul respectiv este inserată în vectorul navetă. Astfel, numai celulele care au încorporat vectorul funcțional vor putea supraviețui în cultură datorită procesului de complementare.

II.1.2 Sistemele de restricție-modificare bacteriene

Nucleazele sau fosfodiesterazele sunt enzime care degradează moleculele acizilor nucleici, modul lor de acțiune constând în hidroliza legăturii fosfodiester din structura lanțurilor polinucleotidice. Aceste enzime sunt prezente în toate celulele și sunt extrem de importante în metabolismul acizilor nucleici. Ele se pot clasifica după mai multe criterii:

i. după modul lor de atac al catenei polinucleotidice discutăm despre **exonucleaze** (acționează la nivelul extremităților 5' sau 3' ale catenelor, având practic nevoie de o extremitate liberă) sau **endonucleaze** (clivează catenele în interiorul lor, neavând nevoie de un cap liber);

ii. după tipul de rupere a legăturii fosfodiester există **nucleazele de tip *d*** care scindează extremitatea 5' și duc la formarea de 3'NMP și **nucleazele de tip *p*** care scindează extremitatea 3' și determină formarea de 5'NMP.

iii. după specificitatea lor față de substrat există **ribonucleaze** (acționează asupra ARN) și **deoxiribonucleaze** (acționează asupra ADN);

iv. după tipul și structura catenelor polinucleotidice pe care le scindează există **nucleaze monocatenare** (care scindează monocatene) și **nucleaze bicatenare** (care acționează asupra dublelor catene).

Exonucleazele au capacitatea de a cliva și îndepărta unul sau mai multe nucleotide de la capătul moleculelor acizilor nucleici. Endonucleazele atacă moleculele în interiorul acestora, unele dintre ele acționând nespecific (nu au nevoie de un situs de recunoaștere la nivelul căruia să-și desfășoare activitatea enzimatică), în timp ce altele recunosc secvențe nucleotidice specifice pentru a-și putea desfășura activitatea catalitică. Acestea din urmă se numesc endonucleaze de restricție.

Inițial, enzimele de restricție au fost descoperite ca făcând parte din cadrul sistemelor de restricție și modificare (metilare) din organismele procariote. În bacterii, reacția de metilare este necesară pentru a realiza diferențierea dintre moleculele proprii de ADN și cele exogene (de obicei aparținând bacteriofagilor). În momentul în care un fag atacă o bacterie, întregul înveliș proteic rămâne la suprafață în timp ce ADN fagic pătrunde în interiorul celulei. Mecanismul prin care celula bacteriană se poate apăra este să poată realiza degradarea moleculelor de ADN străine fără afectarea propriului material genetic (Vassu et al., 2001). Acesta este motivul pentru care bacteriile au dezvoltat sisteme enzimatice de restricție și modificare, astfel încât să se asigure că propriile molecule de ADN vor fi imune la atacul endonucleazelor.

Practic, enzimele de modificare sunt de fapt metilaze care se leagă la aceleași situsuri specifice ca și endonucleazele și realizează metilări ale bazelor azotate. De obicei, gruparea metil este adăugată la nivelul adeninei sau citozinei din situsul de recunoaștere. Odată metilarea realizată, situsul de recunoaștere modificat nu va mai putea fi recunoscut de enzimele de restricție și astfel va fi protejat de acțiunea lor.

Datorită înaltei lor specificități de acțiune, enzimele de restricție au devenit unele dintre cele mai importante instrumente în biologia moleculară. Acestea au capacitatea de acționa asupra ADN dublucatenar prin recunoașterea unor secvențe palindromice cu mărimi variabile (4-8 pb), în prezent existând un număr foarte mare de enzime de restricție, fiecare cu propriul ei situs de recunoaștere (Figura 39). În funcție de mărimea secvenței (de obicei palindromică), enzimele vor tăia molecula de ADN mai des sau mai rar, iar în funcție de poziția situsului de clivare acestea vor furniza fragmente cu capete drepte („*blunt ends*”) sau cu capete coezive („*sticky ends*”).

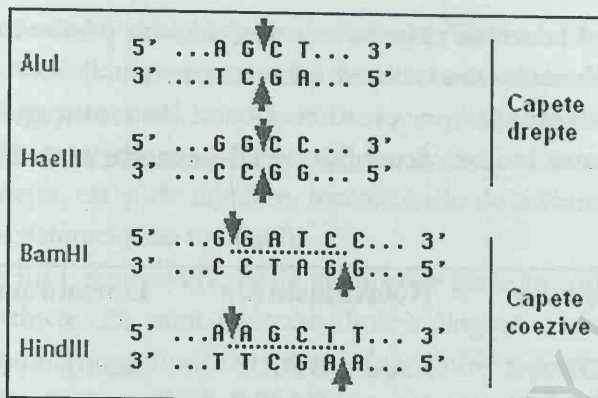


Figura 39. Câteva exemple de enzime de restricție cu situsurile specifice de clivare și tipurile de capete rezultate în urma acțiunii lor.

Descoperirea unui număr extrem de mare de enzime de restricție a impus stabilirea unor reguli generale în ceea ce privește denumirea lor, de fapt un sistem de nomenclatură universal.

Astfel, enzimele de restricție vor avea nume provenite de la speciile bacteriene din care au fost izolate. În practică se folosește un cod de trei litere, în format italic, prima literă provenind de la genul, iar celelalte două de la specia bacteriană din care a fost izolată enzima.

Exemplu: *Sau* – *Staphylococcus aureus*

Mbo – *Moraxella bovi*

Taq – *Thermus aquaticus*

Există și cazuri în care apare și o a patra literă, în format normal, care indică tulpina bacteriană de proveniență.

Exemplu: *EcoR* – *Escherichia coli*, tulpina RY13.

La toate acestea se mai adaugă și o cifră în format roman, în funcție de câte endonucleaze de restricție au fost izolate din specia, respectiv tulpina bacteriană respectivă (Vassu et al., 2001).

Exemplu: *EcoRV* – *Escherichia coli*, tulpina RY13, a cincea enzimă de restricție diferită izolată din această tulpină.

În general, endonucleazele de restricție recunosc secvențe diferite de la nivelul structurii ADN. Cu toate acestea, au fost izolate din diferite specii sau tulpini gazdă enzime care au același situs de recunoaștere.

Enzimele de restricție care recunosc aceeași secvență, dar sunt izolate din gazde diferite se numesc **izoschizomere**. O categorie aparte de enzime izoschizomere sunt

acelea care se leagă la același situs de recunoaștere, dar prezintă situsuri de clivare diferite. Aceste endonucleaze se numesc **neoschizomere**.

Enzimele de restricție care prezintă situsuri de recunoaștere și de restricție diferite dar generează în urma acțiunii lor aceleași capete se numesc **izocaudomere** (Figura 40).

Izoschizomere		Neoschizomere		Izocaudomere	
<i>Rsa I</i>	GT/AC	<i>Rsa I</i>	GT/AC	<i>Mbo I</i>	/GATC
	CA/TG		CA/TG		CTAG/
<i>Afa I</i>	GT/AC	<i>CviQ I</i>	G/TAC	<i>BamH I</i>	G/GATCC
	CA/TG		CAT/G		CCTAG/G
<i>CviQ I</i>	G/TAC				
	CAT/G				

Figura 40. Enzime de restricție izoschizomere, neoschizomere și izocaudomere.

Conform lui Vassu et al., 2001, sistemele de restricție-modificare se împart în trei tipuri:

Sistemele de restricție-modificare de tip II: sunt cele mai des întâlnite și constau în enzime care realizează funcțiile de restricție și de metilare separat, activitatea lor fiind dependentă de prezența ionilor de magneziu. Enzimele de restricție din acest sistem prezintă secvențe de recunoaștere scurte, de 4-6 pb, în cele mai multe cazuri palindromice, și generează prin tăiere atât capete coezive, cât și capete drepte. Ele pot tăia ADN fie la nivelul situsului de recunoaștere, fie la o distanță variabilă de acesta.

S-a observat că toate endonucleazele de tip II prezintă un centru catalitic activ similar format din cinci catene β -pliate flancate de două α -helixuri. În acest centru catalitic activ, conservat spațial, se găsesc trei resturi de aminoacizi esențiali pentru actul catalitic, două resturi acide (acid glutamic și acid aspartic) și un rest de lizină cu caracter bazic, mutațiile la nivelul acestora determinând absența activității enzimatică (Vassu et al., 2001).

Prin studierea acestor enzime, s-a constatat că în urma acțiunii lor la nivelul ADN rezultă capete libere 5'-fosfat, respectiv 3'-hidroxil. Din acest motiv se consideră că legăturile fosfodiesterice dintre nucleotide sunt clivate prin atacul nucleofilic al unei molecule de apă activate asupra grupării fosfat.

Metilazele de tip II conduc la metilarea citozinelor și adeninelor de la nivelul nucleotidelor, obținându-se 5-metil-citozină, 4-metil-citozină sau 6-metil-adenină. Structural, aceste enzime prezintă două domenii separate de o fosă în care este legată molecula de ADN.

Pentru manifestarea actului catalitic, secvența țintă de ADN este denaturată local, pe o anumită porțiune, nucleotidul care urmează a fi metilat este extras de la nivelul dublului helix, este adăugată gruparea metil, iar apoi totul revine în poziția inițială (Vassu et al., 2001).

Sistemele de restricție-modificare de tip I: cuprind enzime care au atât activitate de restricție, cât și de metilare, mecanismele de acțiune ale acestora fiind diferite de cele ale sistemelor de tip II și III.

Enzimele de tip I, sunt codificate de grupuri de gene înrudite și sunt împărțite în trei familii distincte. Ele sunt alcătuite dintr-o singură moleculă proteică care cuprinde trei subunități cu funcții diferite. Una dintre subunități are rolul de a recunoaște secvența țintă, o alta de a metila această secvență, iar cea de-a treia taie ADN la o distanță oarecare de situsul de legare. Secvențele de ADN sunt scindate în funcție de starea în care se găsește situsul de recunoaștere:

i. dacă el este metilat, enzima se leagă la ADN, dar apoi este eliberată fără manifestarea actului catalitic;

ii. dacă este semimetilat, enzima va metila și cealaltă catenă;

iii. dacă este nemetilat, legarea enzimei se va solda cu scindarea dublei catene.

În cazul enzimelor de tip I, clivarea nu apare la situsul de recunoaștere, ci la o anumită distanță de acesta. Scindarea are loc în două etape și este urmată de o acțiune exonucleazică care se realizează cu consum de ATP. O caracteristică interesantă a enzimelor de tip I este aceea că rămân legate la secvența ADN chiar dacă clivarea are loc la distanță de situsul de recunoaștere. O posibilă explicație pentru acest comportament este că enzima care rămâne atașată la nivelul secvenței de recunoaștere poate determina și plierea moleculei de ADN, intrând astfel în contact cu situsul de tăiere (Figura 41).

Sistemele de restricție-modificare de tip III: cuprind enzime care au dublă activitate (restricție/metilare) și sunt cele mai rar întâlnite în natură.

În cazul acestora, enzima este formată din două tipuri de subunități, una responsabilă de restricție, cealaltă responsabilă pentru recunoașterea situsului țintă și pentru metilare. Activitățile enzimactice de restricție, respectiv metilare sunt realizate în același timp. Metilarea se realizează pentru resturile de adenină din dublul helix, exact la nivelul situsului de recunoaștere, în timp ce restricția presupune două incizii succesive pentru cele două catene și apare la distanță față de situsul de recunoaștere.

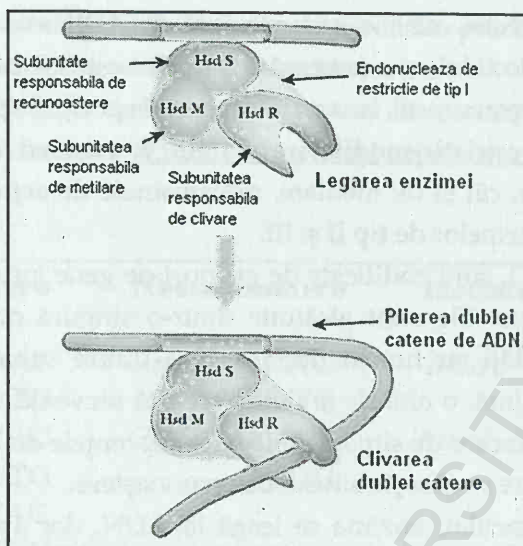


Figura 41. Mecanismul de acțiune al enzimelor aparținând sistemelor de restricție-modificare de tip I (după Clark D., Molecular Biology, 2005).

Recomandări uzuale privind folosirea endonucleazelor de restricție

Numărul și dimensiunile fragmentelor generate de o enzimă de restricție depind de frecvența cu care apar situsurile de recunoaștere ale acesteia la nivelul ADN. Fragmente mici de ADN, utile în studiile de *fingerprinting*, sunt obținute prin digestie cu enzime care recunosc situsuri de maxim 4 pb. Pentru experimentele de cartare genică sau clonare moleculară, unde sunt necesare fragmente mari, precise de ADN, se folosesc enzime care recunosc secvențe mai lungi (peste 8 pb).

Componentele unei reacții enzimatiche de restricție sunt: endonucleaza de restricție, tamponul reacției, ADN țintă și apă ultrapură. Opțional se poate adăuga și albumină serică bovină, aceasta optimizând activitatea enzimatică.

De asemenea, pentru o bună desfășurare a experimentelor, este foarte importantă cantitatea de enzimă introdusă în reacție, dar și intervalul de timp lăsat la dispoziția acesteia pentru realizarea activității enzimatiche. O unitate de activitate a unei enzime este definită ca fiind cantitatea de enzimă necesară pentru digestia completă a 1μg de ADN, în timp de o oră, la temperatura adecvată, într-un volum total de reacție de 50 μl.

Enzimele de restricție se stochează la temperaturi de -20°C și la utilizare se mențin pe gheață. Alegerea enzimei se face în funcție de tipul de probă ADN și de scopul aplicației. Proba ADN trebuie să fie pură și în cantități destul de mari astfel încât prin electroforeză să se poată vizualiza fragmentele obținute. Temperatura optimă de activitate pentru

majoritatea enzimelor este de 37°C, dar există și enzime termostabile, izolate din microorganisme termofile, care acționează optim la 65°C (ex. *Taq I*).

Tehnica RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

În mod normal, secvențele ADN similare prezintă aceeași succesiune de nucleotide și deci, aceleași hărți de restricție. Cu toate acestea există situații în care la nivelul secvențelor apar mici diferențe cauzate de mutații punctiforme, deleții sau inserții.

Fiecare endonuclează de restricție prezintă un situs unic de recunoaștere la nivelul secvențelor de nucleotide și orice modificare a acestuia va avea ca efect stoparea activității nucleazice la acest nivel. Deci, mutațiile pot modifica situsurile de recunoaștere ale unor endonucleaze astfel încât acestea să nu își mai exercite activitatea enzimatică (Figura 42) sau pot genera noi situsuri de recunoaștere.

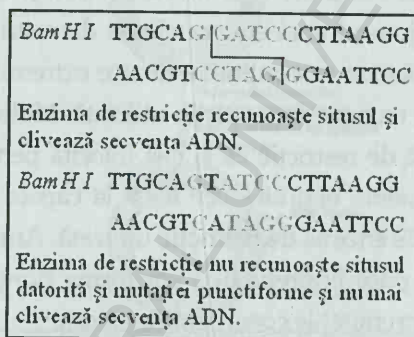


Figura 42. Mutația punctiformă modifică situsul de recunoaștere al endonucleazei *BamH I* astfel încât aceasta nu își mai poate exercita actul catalitic.

În aceste cazuri, hărțile de restricție se modifică în funcție de modificările de secvență nucleotidică apărute și acest fenomen stă la baza principiului tehnicii RFLP. Astfel, dacă realizăm o restricție enzimatică cu una sau mai multe endonucleaze, a două fragmente de ADN a căror secvențe diferă punctual, provenite de la organisme înrudite, vom obține cu o probabilitate foarte mare profile de restricție diferite. Fragmentele obținute în urma reacției de restricție pot fi analizate ușor prin electroforeză în gel de agaroză. Fiecare secvență ADN va genera profile de restricție particulare care diferă prin lungimea fragmentelor rezultate.

Tehnica are aplicații în identificarea și cartarea tulpinilor bacteriene, în analiza organismelor înrudite sau în studiile de criminalistică.

II.2 Clonarea moleculară

II.2.1 Obținerea vectorilor recombinanți

Clonarea moleculară este un procedeu uzual, foarte des folosit în laboratoarele de biologie moleculară. Clonarea constă în decuparea unei gene sau a unui fragment de interes dintr-o anumită sursă biologică, inserarea ADN la nivelul unui vector de clonare, iar apoi multiplicarea acestuia prin introducerea într-o celulă gazdă unde vectorul se poate autoreplica. Orice moleculă hibridă, obținută prin combinarea unor fragmente de ADN provenind din surse diferite se numește moleculă himerică sau recombinantă. Fragmentul de ADN care urmează să fie clonat, introdus la nivelul vectorului, se numește ADN exogen sau insert (Vassu et al., 2001).

Pentru realizarea practică a clonării trebuie parcurși mai mulți pași. Mai întâi, vectorul este decupat cu ajutorul unei endonucleaze de restricție, el suferind un proces de liniarizare. Vectorul liniarizat va conține la fiecare extremitate o parte a secvenței de ADN recunoscută de către enzima de restricție utilizată. Molecula de ADN exogen va fi digerată cu aceeași enzimă de restricție ca și cea folosită pentru liniarizarea vectorului astfel încât diferitele fragmente obținute vor avea la capete aceeași secvență ADN, și anume aceea recunoscută de enzima de restricție utilizată. Atunci când vectorul liniarizat și fragmentele ADN sunt puse împreună se vor forma punți de hidrogen pe bază de complementaritate între extremitățile coezive ale acestora.

Ulterior se adăugă ADN ligaza care catalizează formarea legăturilor fosfodiesterice între capetele fragmentului de ADN exogen și capetele vectorului. În celulă, ligaza are rolul de a reuni fragmentele Okazaki formate în timpul procesului de replicare pe catena întârziată. De asemenea, intervine și în cadrul proceselor reparatorii de la nivelul macromoleculelor de ADN. Ligaza necesită pentru exercitarea activității enzimatică două capete, 3'-hidroxil, respectiv 5'-fosfat, ambele libere și dispuse adiacent. Vectorul astfel obținut este numit și recombinant, deoarece are integrat la nivelul său insertul (Figura 43).

În practică, există și posibilitatea folosirii unor enzime de restricție care să genereze în urma clivării capete drepte. Ligarea acestor capete drepte dintre vector și insert se poate realiza prin utilizarea unei ligaze particulare, izolată din bacteriofagul T4, care are abilitatea de a reforma legăturile fosfodiesterice chiar și în lipsa legăturilor de hidrogen care se formează în cazul capetelor coezive. Procesul de ligare se desfășoară cu consum de ATP (Figura 44).

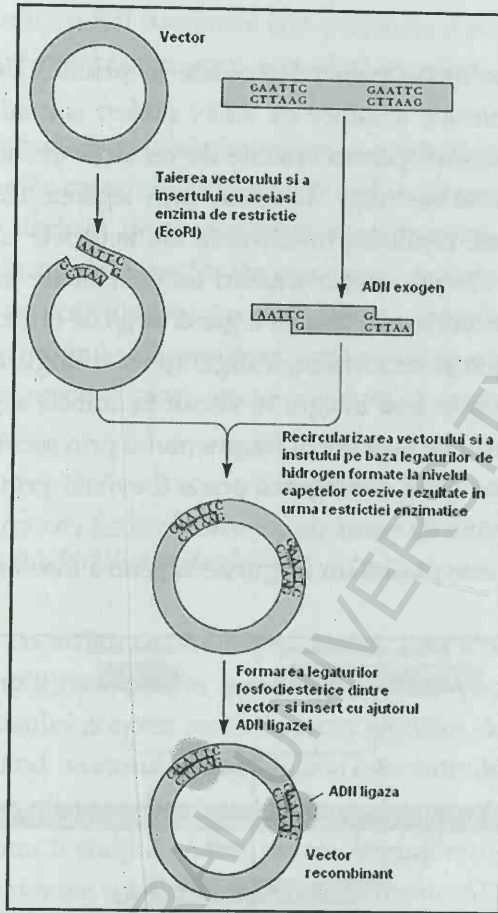


Figura 43. Obținerea vectorilor recombinanți prin acțiunea enzimelor de restricție și a ADN ligazei (după Garrett și Grisham, Biochemistry, 2005).

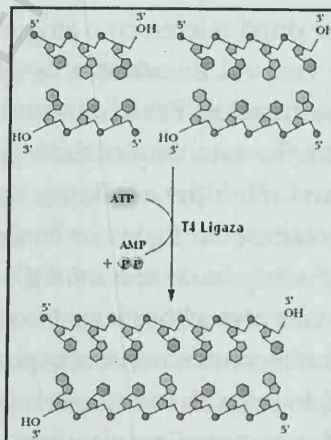


Figura 44. Modul de acțiune al T4 ligazei (după Garrett și Grisham, Biochemistry, 2005).

Pentru eliminarea inconvenientelor create în practică de generarea capetelor drepte, există mici molecule sintetice de ADN (*linkers* sau *adaptor*) care conțin la nivelul secvenței lor situsuri pentru enzime de restricție și care se leagă la capetele drepte ale unei molecule de ADN. Ulterior, prin legarea acestora, se creează noi situsuri de restricție care conduc, prin clivarea lor, la capete coezive (Figura 45). De asemenea, vectorii de clonare conțin situsuri de policlonație la nivelul cărora există multiple secvențe de recunoaștere pentru o gamă largă de enzime de restricție.

Când ADN exogen și vectorul sunt digerați cu o singură enzimă de restricție, insertul are posibilitatea de a se integra în vector în ambele sensuri. În aceste cazuri trebuie determinat sensul de inserare al fragmentului prin secvențializarea vectorului recombinant. Orientarea clară a integrării poate fi evitată prin clivarea vectorului și insertului cu două enzime de restricție diferite. În acest caz vorbim despre o clonare direcționată, deoarece este posibil un singur sens pentru inserarea ADN exogen.

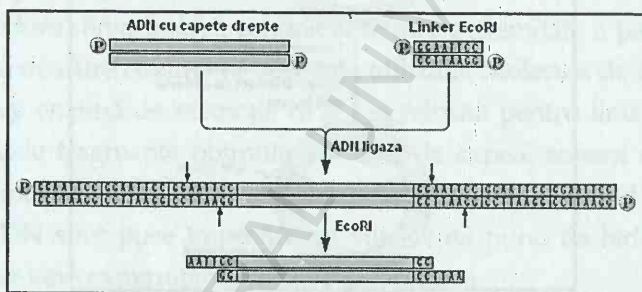


Figura 45. Modul de acțiune al moleculelor de ADN adaptor pentru generarea capetelor coezive (după Garrett și Grisham, Biochemistry, 2005).

În urma clonării realizate după tăierea cu o singură enzimă de restricție există două posibilități practice. Fie vectorul liniarizat se leagă cu insertul, fie vectorul se recircularizează fără a integra insertul. Pentru a favoriza inserarea ADN exogen, recircularizarea vectorului simplu este împiedicată prin tratamentul acestuia cu fosfatază alcalină. Enzima are rolul de a elimina grupările fosfat prezente la extremitatea 5' a vectorului liniarizat, iar ligaza nu mai poate cataliza formarea unei legături fosfodiesterice între cele două extremități, ci numai unirea capetelor defosforilate ale vectorului cu cele nemodificate ale insertului.

După obținerea vectorului recombinant, acesta poate fi introdus prin procedee specifice (vezi Capitolul II.2.2) în interiorul unei celule gazdă. Prezența ADN exogen în structura vectorului nu afectează replicarea acestuia în interiorul gazdei, astfel

încât moleculele himerice pot fi transmise fără probleme dintr-o generație în alta. Cel mai adesea, vectorii recombinanți sunt introduși în celule bacteriene pentru a fi multiplicați.

De obicei, în natură, în celulele bacteriene, există diverse tipuri de plasmide, unele prezente în număr mare, altele în număr redus. Marea majoritate a vectorilor artificiali de clonare derivați de la plasmide sunt prezenți în număr foarte mare (peste 200 de copii) în celulele gazdă. De asemenea, trebuie menționat că nu toate moleculele de ADN se pot clona cu ușurință. Există anumite fragmente, cum ar fi secvențele repetitive, originile de replicare, regiunile telomerice sau centromerice, care ridică probleme practice mari atunci când se dorește manipularea lor prin această tehnică.

II.2.2 Transformarea bacteriilor și drojdiilor

După obținerea vectorilor recombinanți, aceștia sunt integrați într-un organism gazdă în vederea amplificării și apoi a exprimării genei pe care o conțin, dacă se dorește analiza produsului acesteia sau evaluarea efectelor determinate de prezența sa. Practic, atunci când vectorul recombinant este introdus într-o celulă nouă, procesul autonom de replicare asigură atât replicarea vectorului cât și a fragmentului de ADN exogen pe care îl conține. Acest proces asigură multiplicarea vectorului în celulă și permite recuperarea unor cantități importante de ADN exogen. Procesul de integrare a vectorilor recombinanți în celulele gazdă se numește transformare genetică, iar protocoalele practice de lucru diferă pentru celulele procariote sau eucariote.

Transformarea celulelor procariote

Prin procesul de transformare, bacteriile încorporează molecule de ADN libere, situate în afara celulelor (plasmide, vectori recombinanți, fragmente de ADN etc.), menținând stabilă informația genetică conținută de acestea și chiar exprimând-o. Totuși, nu oricare celulă poate să accepte o moleculă de ADN extracelulară. Pentru a realiza practic acest lucru, celula trebuie să se afle într-o stare fiziologică permisivă, stare care poate fi indusă experimental și care este numită stare de competență.

Există mai multe procedee de transformare a bacteriilor *in vitro* cu scopul de a le face competente: tratamentul cu clorură de calciu sau cu enzime specifice capabile să degradeze structura peretelui celular, expunerea celulelor la pulsuri de curent

electric (electroporare) sau bombardarea celulelor cu miniparticule la nivelul cărora sunt adsorbite molecule de ADN.

Transformarea genetică cuprinde două etape:

- i. punerea în contact și adsorbția ADN extracelular la nivelul membranei plasmatică a celulei receptor;
- ii. internalizarea ADN în celulă.

Odată pătrunsă în celula receptoare, molecula de ADN poate fi amplificată, iar ulterior exprimată sau nu.

Pentru a facilita intrarea vectorului prin peretele celular și membrana plasmatică, bacteriile aflate în faza exponențială de creștere trebuie „fragilizate” folosind diverse metode, cum ar fi de exemplu tratarea acestora cu clorură de calciu la o temperatură de 4°C. Ca urmare a acestui procedeu peretele celular și sau/membrana plasmidială devin permeabile temporar datorită formării unor pori. Ulterior, aceste celule competente sunt puse în contact cu soluția care conține vectorul ce trebuie integrat în prezență de polietilen glicol (PEG). Ca urmare a permeabilizării temporare și după aplicarea unui prin șoc termic sau electric, o parte din celulele bacteriene vor integra vectorul. Pentru a putea selecționa numai bacteriile care au integrat vectorul, acestea vor fi cultivate într-un mediu de cultură care conține și factorul de selecție. Acesta este de cele mai multe ori antibioticul corespunzător genei de rezistență conținute de către vector. Prin acest proces, plasmida integrată se va multiplica în celule, amplificând astfel și secvența clonată.

Transfecția celulelor eucariote

Introducerea vectorilor în celulele eucariote se poate face în mai multe moduri, în funcție de tipul celular cu care se lucrează și tipul de vector. Pentru a elimina ambiguitățile precizăm că în cazul eucariotelor, pentru procesul de introducere a ADN exogen în celulă și pentru integrarea acestuia la nivelul materialului genetic propriu, se utilizează termenul de transfecție.

Transfecția celulelor de drojdii: o primă tehnică de transfecție presupune incubarea sferoblastele (celule lipsite de perete celular) în prezență de ADN recombinant, polietilen glicol și clorură de calciu. Acest tratament va facilita pătrunderea ADN exogen în interiorul celulelor.

În cadrul unei alte metode, celulele sunt tratate cu clorură de litiu, substanță care are ca efect fragilizarea membranelor. Ioni de litiu au capacitatea de a induce

formarea unor pori la nivelul membranei celulare al drojdiilor. Tratamentul este urmat de incubarea celulelor receptoare cu vectorul recombinant, în prezența PEG care are rolul de a concentra moleculele de ADN transformant.

Intrarea vectorilor în celule poate fi stimulată și prin șocuri electrice (electroporarea). În cadrul acestei tehnici, celulele drojdiilor sunt mai întâi tratate cu un agent labilizator al membranei celulare, iar mai apoi sunt supuse unor pulsuri electrice cu un anumit voltaj, în prezența vectorului recombinant, pentru un anumit interval de timp. Pulsurile electrice determină un proces de dezorganizare reversibilă a membranei plasmatică, fapt care conduce la o creștere substanțială a permeabilității acesteia. Condițiile experimentale pentru electroporare variază de la un protocol la altul și sunt determinate exclusiv prin încercări practice în laborator. Totuși, este important de știut că celulele receptoare trebuie să fie în faza logaritmică de creștere, concentrația vectorului nu trebuie să depășească anumite valori, iar intensitatea și durata pulsului electric aplicat trebuie controlată strict pentru a nu genera dezorganizarea definitivă a membranei celulare.

Vectorul recombinant poate fi menținut în celula transformată fie sub formă integrată la nivelul ADN genomic, fie sub formă replicativă, independentă de ADN cromozomal. Vectorul trebuie să posede capacitate de replicare independentă, aceasta fiindu-i conferită de secvențele ARS (*Autonomus Replicating Sequence*). Vectorii care nu conțin secvențe ARS trebuie neapărat să se integreze la nivelul genomului prin recombinare omologă, aceasta determinând obținerea de drojdii recombinante, transformate stabil.

În cazul celulelor eucariote superioare aflate în cultură, protocoalele de transformare sunt mai complexe și necesită optimizări multiple și abordări tehnice moderne pentru a asigura randamente crescute. Tehnicile de transformare de nouă generație utilizează lipozomi pentru introducerea vectorilor prin membrana plasmatică a celulelor eucariote aflate în cultură. În aceste cazuri nu există protocoale standard care să poată fi aplicate tuturor tipurilor de celule, ci numai recomandări generale privind parametri care trebuie optimizați în vederea unor experimente reușite. Astfel, pot fi optimizate rapoartele dintre reactivii necesari transformării, ales cu grijă tipul de plasmidă pe care dorim să o introducem în celulă, timpul necesar procesului sau densitatea celulelor supuse transfecției.

Transfecția celulelor vegetale: în cazul celulelor vegetale există o serie de tehnici care permit transferul direct de gene. În această situație, peretele celular vegetal reprezintă un impediment major în calea integrării ADN în celulă. De aceea, este

necesară prepararea de protoplaste vegetale prin digestia prealabilă a peretelui celular celulozic. Ulterior, protoplastele sunt amestecate cu o soluție de ADN, fără a fi obligatoriu ca genele pe care dorim să le introducem în celulă să fie purtate de vectori de transformare. Aplicarea unor condiții fizico-chimice adecvate vor provoca o permeabilizare temporară și reversibilă a membranei plasmatice a protoplastelor care va permite moleculelor de ADN să penetreze în celulă.

În continuare, acele molecule de ADN intrate în interiorul celulelor trebuie să atingă nucleul și să se integreze prin recombinare la nivelul unui cromozom al celulei vegetale. Amestecul ADN folosit conține și o plasmidă purtătoare a unei gene a cărei expresie conferă rezistență la un agent selectiv, în scopul selecționării celulelor transformate. Protoplastele astfel tratate sunt cultivate mai întâi pe un mediu neselectiv pentru a li se permite să-și sintetizeze un nou perete celular și apoi sunt crescute în prezență de agent selectiv în scopul eliminării tuturor celulelor netransformate. Celulele de interes, rămase viabile, sunt supuse procesului de regenerare în scopul obținerii de plante transgenice. Acestea vor fi ulterior caracterizate molecular pentru verificarea integrării genei de interes la nivelul genomului, estimarea numărului de copii transferate și evaluarea expresiei genelor introduse și integrate în celulă.

Cele mai utilizate tehnici de introducere a ADN într-un protoplast sunt: folosirea polietilen-glicolului, electroporarea sau tunul de particule. PEG este un polimer care provoacă fuziuni între membranele plasmatice. În cazul transferului direct al genelor, acesta destabilizează local și reversibil membrana plasmatică a protoplastului, rezultatul fiind penetrarea moleculelor de ADN în citoplasmă. Tehnica de electroporare presupune aplicarea unui șoc electric amestecului de ADN-protoplaste care va destabiliza reversibil structura membranei și va permite trecerea moleculelor de ADN în citoplasmă (Figura 46).

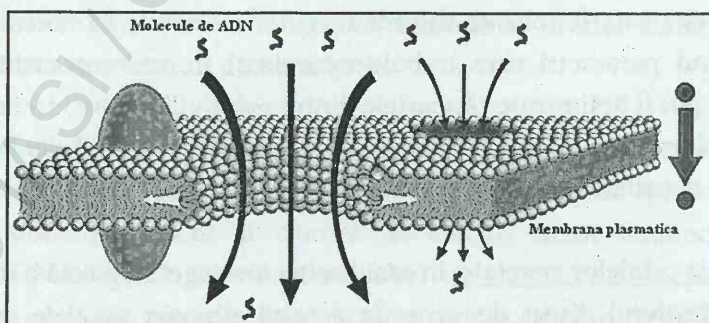


Figura 46. Electroporarea: impulsurile electrice destabilizează membrana plasmatică și crează pori prin care moleculele de ADN pot trece în citoplasmă.

Tehnica care utilizează tunul de particule este aplicabilă și celulelor animale. Principiul constă în introducerea ADN în celule prin propulsarea directă, forța de propulsie fiind obținută fie prin explozia unei substanțe, fie prin decompresia unui gaz (cel mai des folosit este heliul). Astfel, „ADN nud” care urmează să fie introdus în celule este mai întâi precipitat pe bile tungsten sau aur cu diametrul de aproximativ 1μm. Aceste microproiectile vor fi proiectate către celule și unele dintre ele vor reuși să penetreze membrana celulară ducând ADN de interes în citoplasmă. Această tehnică a permis obținerea de numeroase plante transgenice pentru specii până în prezent refractare ca de exemplu grâul.

Transfecția celulelor animale: pentru introducerea de gene în celulele animale au fost dezvoltate mai multe tehnici. Introducerea unei secvențe de ADN în celulele animale permite analiza *in vivo* a rolului acestei secvențe, determinarea funcției unei gene sau identificarea secvențelor reglatoare care controlează expresia genei. Vectorii folosiți trebuie să posede elemente esențiale cum ar fi: o origine de replicare și un marker de rezistență la un antibiotic, secvențe eucariote care controlează inițierea transcripției (promotori) și maturarea transcripților, un marker de selecție care să permită supraviețuirea celulelor recombinante pe un mediu selectiv și gena care urmează a fi introdusă în celula de interes.

Pentru a introduce ADN în celulele animale sunt practicate două abordări experimentale diferite: pe de o parte transfecția unui vector de expresie sub formă de „ADN nud”, iar pe de altă parte transferul ADN recombinant în urma unui proces de infecție virală. Numărul de copii de ADN străin integrate în genomul celulei gazdă poate varia de la 1 la 100 în funcție de tipul celular folosit, natura ADN recombinant și diferiți parametri fizico-chimici de introducere a ADN. De asemenea, alegerea unei tehnici de introducere depinde și de natura celulelor folosite și de tipul de expresie dorit pentru ADN exogen. Câteva dintre metodele de transfecție ale celulelor animale sunt trecute în revistă în continuare:

i. utilizarea fosfatului de calciu – cu ajutorul acestei metode se obțin precipitate de ADN în cantități foarte mari. Creșterea concentrației de ADN la nivelul precipitatului obținut se poate realiza amestecând plasmida recombinantă cu un ADN „antrenant”, cum ar fi ADN din spermă de somon.

ii. utilizarea DEAE-dextran – acesta este un policaion care facilitează absorbția ADN pe o membrană plasmatică, favorizând ulterior pătrunderea acestuia în interiorul celulelor. În plus, acesta protejează molecula de ADN împotriva acțiunii

nucleazelor, crescând capacitatea sa de exprimare în celulă. Totuși, DEAE-dextranul poate fi toxic pentru celule și de aceea optimizarea condițiilor de transfecție se realizează în funcție de sensibilitatea celulelor gazdă față de acest compus.

iii. folosirea lipozomilor - permite includerea ADN străin în vezicule membranare artificiale, acestea urmând să penetreze în celula gazdă prin endocitoză.

iv. fuziunea protoplastelor - plecând de la bacterii sunt preparate protoplaste care conțin plasmida recombinantă. Acestea sunt apoi puse în contact cu celulele animale. Fuziunea membranelor celulare este favorizată de adăugarea de polietilen-glicol și va permite încorporarea plasmidei în celula gazdă.

v. electroporarea.

II.2.3 Metode de detecție a vectorilor recombinanți în celule

După cum am văzut până acum, obținerea vectorilor recombinanți și introducerea acestora în interiorul celulelor gazdă se realizează practic prin procedee laborioase care necesită multe etape și un timp relativ îndelungat. Totuși, problemele legate de clonarea moleculară nu se sfârșesc aici. Astfel, în momentul în care dorim introducerea ADN exogen la nivelul vectorului există două posibilități: vectorul să se recircularizeze fără a insera ADN exogen la nivelul său sau recircularizarea să se facă după primirea fragmentului de ADN de interes. În acest context apare necesitatea diferențierii între celulele care au primit vectorul recombinant și cele care conțin numai vectorul recircularizat fără insertul de ADN exogen?

Astfel, a apărut necesitatea dezvoltării unor metode de detectare a prezenței recombinanților la nivelul celulelor gazdă. Plasmida recircularizată poate fi detectată ușor prin cultivarea celulelor pe medii cu agent de selecție (antibiotic), genele de rezistență de la nivelul acestora asigurând supraviețuirea în astfel de condiții. Dar cum putem estima prezența ADN exogen la nivelul vectorului?

În cazul în care ADN exogen este reprezentat de o genă întreagă, care codifică pentru o proteină anume, detectarea se face cu ușurință prin monitorizarea prezenței acestei proteine la nivelul mediului de creștere.

În cazurile în care insertul nu este reprezentat de o genă întreagă lucrurile se complică, existând mai multe posibilități de detectare. Una dintre abordările cele mai utilizate este metoda directă de *screening*, care presupune verificarea tuturor coloniilor care se dezvoltă pe mediile conținând agent de selecție.

O primă abordare, practică la începutul experimentelor de clonare, dar cu aplicabilitate și la ora actuală, este reprezentată de metoda directă de verificare a tuturor coloniilor care se dezvoltă pe mediile conținând antibiotic. Practic, toate au primit vectorul, iar prin analizarea fiecăreia se determină care dintre ele deține și insertul. Astfel, coloniile sunt crescute separat, iar plasmida este extrasă și analizată prin diferite metode.

Una dintre metode se bazează pe scindarea vectorului cu enzimele de restricție utilizate la introducerea insertului urmată de vizualizarea electroforetică a fragmentelor obținute. Dacă insertul lipsește, atunci, în urma restricției, se va realiza o convertire a formei circulare a vectorului la o formă liniară, iar la separarea în gel se va obține un singur fragment. În cazul în care ADN exogen a fost inclus în vector, prin restricție vor rezulta două fragmente, unul reprezentat de insert, celălalt de plasmida inițială. Oricare ar fi rezultatul reacției de restricție, produșii obținuți sunt supuși unei electroforeze în gel de agaroză, identificându-se numărul și mărimea fragmentelor obținute.

O altă metodă folosește tehnica de secvențializare pentru a identifica prezența sau absența insertului. Totuși, indiferent de metoda utilizată, verificarea sistematică a tuturor coloniilor necesită extrem de mult timp și implică costuri considerabile.

O altă abordare utilizează două gene de rezistență la antibiotice. Una dintre ele este folosită ca marker de selecție pentru mediul de creștere al celulelor, iar cealaltă ca marker pentru primirea insertului. În acest caz, situsul de clonare, la nivelul căruia se inseră ADN exogen, este situat în interiorul celei de-a doua gene de rezistență. Prin introducerea unui fragment străin de ADN la nivelul acesteia ea va deveni inactivă (inactivare inserțională), iar celulele care primesc vectorul recombinant nu vor supraviețui decât pe un mediu de creștere cu un singur agent de selecție (Figura 47). Celulele care au primit vectorul recircularizat, fără insert, vor crește și pe mediul conținând ambele antibiotice, pentru care există gene de rezistență.

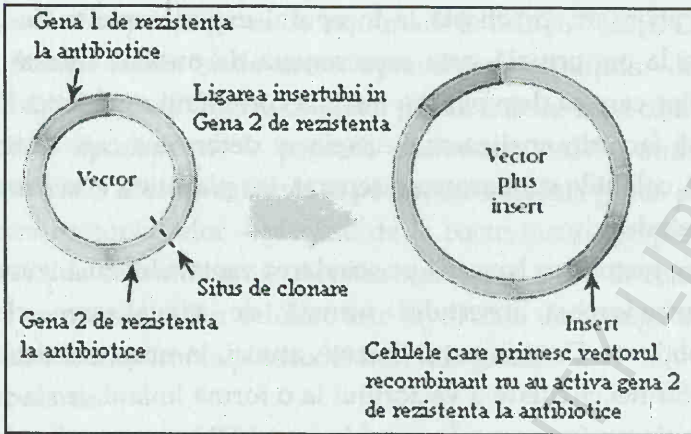


Figura 47. Detecția vectorilor recombinanți prin inactivare inserțională (după Clark D., Molecular Biology, 2005).

O altă metodă de detecție utilizează analiza de culoare a coloniilor. Procesul de scanare a culorilor este numit *screening* alb-albastru și utilizează enzima β -galactozidază și compusul X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranozid) în mediul de creștere al bacteriilor. În acest caz, vectorul folosit conține capătul 5' al genei *lacZ* care codifică o formă trunchiată a enzimei β -galactozidază, formă care are în componență 146 de aminoacizi de la capătul N-terminal. Concomitent este utilizată și o gazdă bacteriană specifică care deține la nivelul cromozomului partea lipsă a genei codificatoare a β -galactozidazei.

În situația în care vectorul pătrunde în celulă va avea loc sinteza a două fragmente ale β -galactozidazei (unul N-terminal codificat de vector și unul C-terminal codificat de ADN de la nivelul cromozomului gazdei). Ulterior, cele două fragmente se vor autoasambla (situație unică întâlnită numai în cazul acestei enzime) formând o proteină activă din punct de vedere enzimatic (Figura 48).

Totodată, în vector, foarte aproape de capătul 5' al genei β -galactozidazei, este introdus situsul de policlonare. Dacă, la nivelul acestuia, nu are loc inserția ADN exogen, atunci se va produce fără probleme partea N-terminală a enzimei care va fuziona cu cea C-terminală produsă de gazdă rezultând forma activă a β -galactozidazei. Aceasta degradează X-gal conținut în mediu ceea ce produce o culoare albastră a coloniilor.

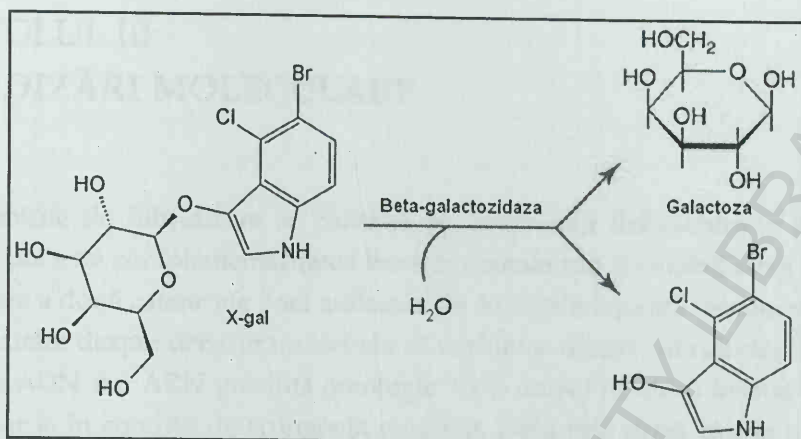


Figura 48. Reacția de degradare a X-gal catalizată de β -galactozidază.

Dacă ADN exogen se inseră în vector, secvența acestuia va produce o deplasare a cadrului de citire pentru gena *lacZ* ceea ce se va solda cu sinteza unei proteine defective care nu se va putea asambla cu partea C-terminală sintetizată de gazdă. Astfel, nu se va forma enzima activă, X-gal conținut în mediu nu va fi degradat, iar culoarea coloniilor va rămâne albă. În acest mod, prin simpla analiză a culorii coloniilor crescute pe mediu conținând X-gal, se va putea afla care dintre acestea conțin insertul și care nu.

CAPITOLUL III

HIBRIDIZĂRI MOLECULARE

Tehnicile de hibridizare se bazează pe proprietăți fizico-chimice ale acizilor nucleici cum este complementaritatea bazelor azotate sau reversibilitatea procesului de separare a două catene ale unei molecule de ADN (denaturare-renaturare). Atunci când discutăm despre denaturare trebuie să vorbim și despre hibridizare. Dacă două catene de ADN sau ARN prezintă omologie 100% atunci hibridul format de ele este stabil chiar și în condiții de stringență crescută. Dacă cele două catene nu prezintă nici un grad de omologie, renaturarea lor nu va avea loc. În cazuri intermediare (omologie parțială între cele două secvențe), hibridul format va fi instabil în anumite condiții (ex. temperatură de peste 65°C), dar va fi stabil în condiții mai blânde.

Hibridizarea moleculară permite identificarea și analiza unei molecule de acid nucleic specifice dintr-o populație heterogenă. Un prim pas îl reprezintă realizarea sondei prin marcarea unui fragment monocatenar de ADN/ARN cu un compus radioactiv, chemiluminescent sau fluorescent. Fragmentul ales trebuie să fie complementar cu secvența țintă pe care dorim să o identificăm. Marcarea radioactivă a sondelor se poate realiza cu ^{32}P , ^{35}S sau alți izotopi radioactivi. Pentru marcarea chemiluminescentă se folosesc enzime precum fosfataza alcalină sau peroxidaza care clivează un substrat specific producând chemiluminescență la nivelul situsului de acțiune de pe membrană.

Moleculele țintă sunt aduse în stare monocatenară și sunt fixate pe o membrană specială. Cele mai des folosite membrane sunt confecționate din nitroceluloză, nylon sau nylon încărcat pozitiv. Marele avantaj al membranelor de nylon este acela că sunt foarte robuste și pot fi reutilizate de mai multe ori comparativ cu cele de nitroceluloză care sunt mult mai fragile. Totuși aceste membrane, deși fragile, au proprietatea de a reduce la minimum semnalul de fundal în cazul utilizării anumitor marcaje. Semnalul de fundal prezent în toate tipurile de hibridizare este destul de accentuat în momentul utilizării membranelor de nylon și crește foarte mult atunci când sondele folosite sunt marcate neradioactiv. Un alt avantaj al membranelor de nylon este faptul că acestea leagă de cinci ori mai mult ADN pe unitatea de suprafață comparativ cu cele de nitroceluloză. Totodată, membranele de nylon pot reține și fragmente de acizi nucleici cu mărimea de până la 50 de nucleotide, în timp ce nitroceluloza este inefficientă în legarea fragmentelor mai mici de 500 de nucleotide.

Moleculele sondă monocatenare și fragmentele denaturate sunt puse în contact prin incubarea membranei în condiții care să permită renaturarea. Atunci când sonda recunoaște omologul său în populația de molecule țintă, ea se leagă la acesta pe bază de complementaritate, iar hibridul format va fi identificat datorită marcatorului de pe sondă. Hibrizii de interes, rămași legați la membrană, vor putea fi evidențiați prin tehnici specifice, în funcție de tipul de marcator pe care îl posedă sonda. Una dintre cele mai importante inovații adusă metodelor de hibridizare a fost utilizarea tampoanelor alcaline de transfer împreună cu membranele de nylon încărcate pozitiv ceea ce a avut drept rezultat legarea moleculelor de acizi nucleici la membrană și astfel eliminarea etapei de fixare post-transfer, etapă absolut necesară în cazul folosirii membranelor de nitroceluloză sau a celor de nylon neutre.

Principala condiție care asigură reușita unui experiment de hibridizare este selectarea unei sonde adecvate. Prin sondă moleculară înțelegem orice secvență de acid nucleic ADN sau ARN, având cel puțin 20-25 de nucleotide, omoloagă cu o altă secvență celulară de ADN sau ARN și care are capacitatea de a hibridiza cu aceasta într-un mod stabil și specific pe baza reasocierii bazelor complementare. Sondele folosite în tehnicile de hibridizare moleculară pot fi de două tipuri: **directe** (corespunzătoare secvenței pe care dorim să o identificăm) și **indirecte** (recunosc polimorfisme de restricție corelate cu secvențele pe care dorim să le identificăm).

Sonde directe: sunt reprezentate de secvențe de acizi nucleici care corespund în totalitate sau parțial unei regiuni din genom, pe care le recunosc specific și le leagă pe bază de complementaritate. Există mai multe tipuri de sonde directe: fragmente de ADN complementar (ADNc), fragmente de ADN genomic, ribosonde, fragmente oligonucleotidice sintetice și secvențe de ADN exogen.

Ribosondele sunt secvențe de ARN obținute *in vitro* prin transcrierea cu ajutorul unei ARN polimeraze a unui fragment de ADNc sau de ADN genomic. Oligosondele sintetice sunt secvențe de ADN sau ARN monocatenare sintetizate *in vitro* cu ajutorul sintetizatoarelor automate de acizi nucleici.

Sonde indirecte: sunt reprezentate de fragmente de ADN provenite din bănci de ADN genomic și se utilizează cu precădere atunci când genele pe care dorim să le studiem sunt necunoscute. Pentru a putea fi folosite cu succes ele trebuie să nu conțină secvențe înalt repetitive astfel încât să recunoască un număr cât mai redus de regiuni de la nivelul țintei și să poată pune în evidență un polimorfism de restricție utilizabil drept marker molecular. Cel mai des aceste tipuri de sonde corespund unor secvențe intergenice necodificatoare și nu sunt utile la detectarea secvențelor codante.

III.1 Tehnica Southern Blotting

Metoda a fost descrisă în 1975 de către Edwin Southern și combină electroforeza ADN cu hibridizarea moleculară. Cu ajutorul acesteia au putut fi obținute informații în premieră legate de organizarea efectivă a secvențelor unice sau a regiunilor aflate într-un număr mare de copii la nivelul genoamelor eucariote complexe. Totodată, de utilizarea acestei tehnici sunt legate și descoperiri extrem de importante cum este de exemplu identificarea intronilor la nivelul genelor eucariote. Deși există o serie întreagă de posibilități de combinare a diferitelor tipuri de membrane, tamponi de transfer sau metode de transfer, punerea în practică a acestei tehnici este relativ ușoară.

O secvență de ADN dată este caracterizată de succesiunea nucleotidelor care o compun. În cazul *Southern Blotting*, sonda este constituită dintr-o moleculă de ADN, cum ar fi de exemplu ADN plasmidial exogen, un fragment de ADN genomic sau ADN complementar. ADN țintă este mai întâi izolat, denaturat, separat prin electroforeză și apoi transferat pe o membrană de nitroceluloză sau nylon prin capilaritate. După punerea în contact a membranei cu sonda marcată în condiții optime pentru procesul de hibridizare sunt efectuate mai multe spălări în vederea evidențierii unor benzi marcate, corespunzătoare sondei.

Etapile care trebuie parcurse pentru realizarea tehnicii (Figura 49) sunt:

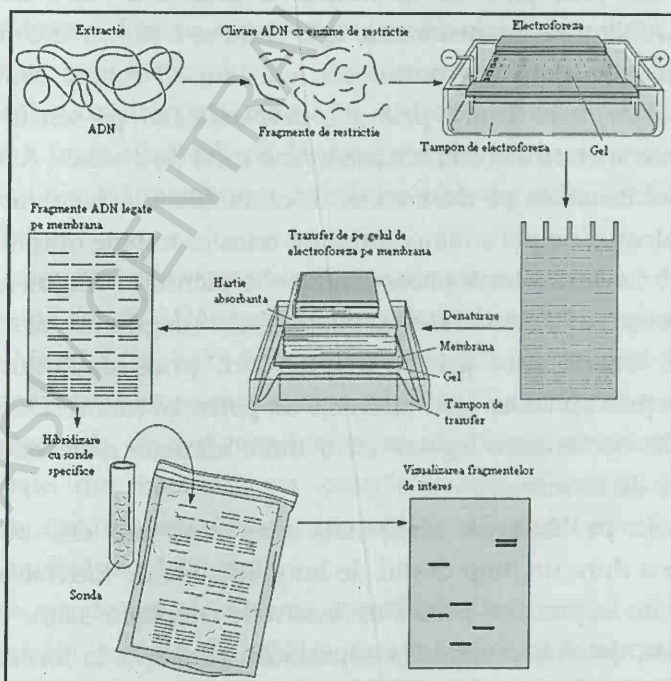


Figura 49. Etapele tehnicii Southern Blotting (după Garrett și Grisham, Biochemistry, 2005).

1. *Extracția și purificarea ADN genomic.* Cantitatea de ADN care urmează să fie utilizată trebuie optimizată cu atenție în funcție de cât de abundentă este ținta și de tipul de marcare folosit pentru sondă.

2. *Fragmentarea ADN genomic cu enzime de restricție* (se folosesc mai multe enzime diferite). Fragmentele rezultate nu trebuie să fie mai mari de 10-12 Kpb deoarece nu vor mai putea fi separate ulterior.

3. *Separarea fragmentelor prin electroforeză în gel de agaroză sau poliacrilamidă.* Gelurile de poliacrilamidă se pretează cel mai bine pentru separarea moleculelor de ADN cu mărimea cuprinsă între 25 și 2000 pb, iar agaroză poate fi utilizată la migrarea și separarea unor fragmente și de 10 ori mai mari decât acestea.

4. *Denaturarea.* Odată separate prin electroforeză, fragmentele de ADN țintă aflate încă în gel sunt introduse într-o soluție de hidroxid de sodiu. Tratamentul alcalin are rolul de a denatura duplexul ADN, rezultând în final numai fragmente monocatenare. Totodată, eventualele fragmente de ARN contaminante sunt îndepărtate. La final, valoarea de pH a gelului este ajustată de la alcalin la neutru prin tratamentul cu tamponi specifici.

5. *Transferul pe un suport solid* (membrană de nylon sau nitroceluloză). Transferul are loc prin punerea în contact a gelului în care au fost separate fragmentele de ADN țintă cu membrana, aplicându-se o presiune constantă pe toată suprafața pentru a asigura un contact cât mai bun. O soluție salină concentrată (tampon de transfer) este trecută prin gel, perpendicular pe sensul de migrare al fragmentelor țintă la electroforeză, aceasta având rolul de a scoate ADN din gelul de separare și de a-l transfera pe membrană. În cazul folosirii membranelor fragile de nitroceluloză valoarea de pH a tamponului de transfer trebuie optimizată extrem de atent deoarece o valoare neutră poate conduce la pierderea fragmentelor scurte de ADN, în timp ce un pH puternic alcalin poate afecta integritatea membranei. Soluția salină poate fi trecută prin gel în trei moduri: prin capilaritate, cu ajutorul vacuumului sau prin aplicarea unei diferențe de potențial (*electroblotting*). Interacțiile de natură ionică vor asigura legarea cu o mare afinitate a moleculelor de ADN încărcate negativ de membrană.

Transferurile pe bază de capilaritate sunt cele mai des utilizate, dar au dezavantajul de a dura un timp destul de lung. Metoda de *Electroblotting* este mult mai rapidă, dar nu se pretează pentru utilizarea de tamponi salini concentrați. De asemenea, această variantă conduce la supraîncălzire și apoi la formarea de bule de aer între membrană și gelul de electroforeză. În cazul gelurilor de poliacrilamidă este

preferată realizarea unui *electroblotting* deoarece transferul prin capilaritate este foarte dificil.

După transferul propriu-zis se va încerca o imobilizare cât mai bună a moleculelor de ADN aflate pe membrană. Astfel, pentru membranele de nitroceluloză se practică de obicei incubarea în vid sau la 80°C pentru a asigura atașarea permanentă a ADN. Aceste tratamente conduc la eliminarea moleculelor de apă de hidratare și asigură apariția unor legături hidrofobe relativ slabe între suport și ADN. În situația folosirii nylonului neutru se realizează o fixare prin expunere la radiație UV (se vor forma legături covalente între suport și ADN), cu condiția ca membrana să fie foarte bine uscată în prealabil. Sursa, intensitatea și durata de aplicare a radiației UV trebuie verificate și calibrate atent deoarece o expunere necontrolată poate conduce la pierderea unei cantități importante de ADN. Pentru membranele de nylon încărcate pozitiv nu mai este necesar pasul de fixare deoarece ADN a fost deja legat în timpul transferului prin utilizarea tampoanelor puternic alcaline.

Modelul de distribuție al fragmentelor de ADN din gelul de electroforeză se va menține identic și la nivelul membranei de transfer. Pentru a fi siguri de eficiența transferului, gelul de electroforeză poate fi colorat și vizualizat pentru a vedea dacă mai există eventuale benzi de ADN la nivelul acestuia.

6. *Prehibridizarea*. Pentru a parcurge această etapă, membrana pe care se va realiza transferul este incubată cu o soluție care conține dizolvată o proteină (albumină serică) și un detergent cum ar fi dodecil-sulfatul de sodiu. Acest pas are rolul de a satura toate situsurile de legare potențial active a moleculelor de ADN rămase libere la nivelul membranei astfel încât să nu existe nicio posibilitate de legare nespecifică.

7. *Hibridizarea cu sonda monocatenară*. Membrana este incubată în prezența unei soluții care conține sonda ADN a cărei secvență nucleotidică a fost selectată special pentru a putea hibridiza pe bază de complementaritate cu secvența țintă. Sonda este marcată radioactiv sau fluorescent pentru a putea fi ulterior detectată. Practic, în urma acestei etape, la nivelul membranei se vor forma structuri dublucatenare specifice rezultate din împerecherea complementară a sondei cu ADN țintă. Totodată, pentru a reduce legările situs-nespecifice ale sondei se utilizează soluții de formamidă deionizată sau detergenți.

8. *Spălarea membranei și revelarea semnalelor*. După etapa de hibridizare se parcurge obligatoriu o etapă de spălare a membranei cuampoane specifice (ex. tampon SSC - *Saline Sodium Citrate* - care conține citrat trisodic și clorură de sodiu)

pentru a înlătura excesul de sondă ce ar putea interfera în procesul de evidențiere a situsurilor la nivelul cărora a avut loc hibridizarea propriu-zisă. Vizualizarea se face ulterior prin diferite metode, în funcție de tipul de marcarea de la nivelul sondei. Sensibilitatea semnalului obținut depinde de un număr mare de factori experimentali cum este natura sondei (cu cât sonda este mai lungă, cu atât rezultatul obținut va fi mai bun) sau intensitatea semnalului (raportul semnal/semnal de fond care depinde foarte mult de natura sondei și de calitatea spălărilor efectuate).

Metoda are multe inconveniente, cum ar fi timpul foarte lung necesar pentru realizarea ei, multitudinea de etape experimentale care afectează mult reproductibilitatea și faptul că nu se pretează la automatizare.

III.2 Tehnica *Northern Blotting*

Secvențele specifice de ARN și în special moleculele de ARN mesager pot fi detectate și studiate utilizând tehnica *Northern Blotting*. Metoda este similară cu *Southern Blotting*, numele ei derivând dintr-o analogie cu aceasta, și permite studiul moleculelor de ARN dintr-un amestec heterogen.

În *Northern Blotting* sonda este constituită dintr-o moleculă de ADN sau ARN, iar secvența țintă este reprezentată de ARN. Diferențe mari față de *Southern Blotting* apar în special în etapa de preparare și separare în gel a probelor. În acest caz nu mai este necesar pasul de clivarea cu enzime de restricție a moleculelor de ARN deoarece acestea au deja lungimi convenabile care se pretează pentru separarea prin electroforeză.

Din cauza multiplelor structuri secundare formate de moleculele de ARN este evident necesară asigurarea unor condiții denaturante la migrarea electroforetică. Acestea presupun adăugarea formamidei sau formaldehidei în gel sau tratarea cu glioxal sau dimetil-sufoxid (DMSO) a probelor ARN înainte de a fi supuse migrării. De obicei, pentru separare se utilizează gelurile de agaroză, dar, în cazul moleculelor foarte scurte de ARN (microARN - miARN -), se recomandă folosirea gelurilor de separare pe bază de poli(acrilamidă). Moleculele de miARN au lungimi de 20-25 de nucleotide și ca atare sunt prea scurte pentru a putea fi separate în agaroză.

Dificultățile ridicate de punerea în practică a acestei metode sunt direct legate de anumite caracteristici ale moleculelor de ARNm cum ar fi:

- i. mare vulnerabilitate față de ribonucleaze;
- ii. mare variabilitate la nivel celular;
- iii. specializare în funcție de tipul celular;

iv. anumite forme sunt prezente într-un număr foarte mic (există transcripți care reprezintă doar 1/100.000 din totalul de ARNm produs în celulă).

Inițial, ARN este izolat și purificat din țesut, iar apoi este separat prin electroforeză în gel de agaroză, sistem denaturant (în prezență de glioxal sau formaldehidă), sau poli(acrilamidă în concentrație mare (15%). Datorită abundenței și marii stabilități a moleculelor de ARNr există riscul ca acestea să interfere cu semnalul ARNm. Astfel, pentru a izola moleculele de ARNm din ARN total se utilizează tehnici cromatografice care folosesc fragmente oligo-dT (oligo-deoxitimidin 5'fosfat) pentru a lega numai acele molecule de ARN care prezintă coadă poliadenozinică (poliA). Dacă astfel de modalități de separare nu sunt posibile, la interpretarea finală a semnalelor, orice bandă apărută în apropierea celor corespunzătoare ARNr va fi exclusă din analiză.

Moleculele separate sunt transferate pe o membrană de nylon sau de nitroceluloză. Tamponul de transfer trebuie să conțină formamidă deoarece aceasta are rolul de a scădea temperatura de hibridizare a sondei cu moleculele țintă, aceasta având ca efect protejarea ARN față de temperaturile înalte la care se poate degrada. Membranele preferate pentru *Northern Blotting* sunt cele de nylon deoarece acest material rezistă cu succes condițiilor necesare transferului ARN (formamidă 50% și temperaturi de 60°C) și care ar afecta integritatea nitrocelulozei.

În cazul transferului ARN nu este recomandată folosirea tamponelor alcaline pentru că stabilitatea acestui acid nucleic la valori crescute de pH este mult mai scăzută decât în cazul ADN, acestea putând genera un proces de hidroliză chimică, mai ales la moleculele scurte de tipul miARN. Eventuala hidroliză bazică este imposibil de controlat în condiții experimentale și poate conduce la distrugerea totală a țintei și la pierderea semnalului după hibridizare. Metodele de transfer recomandate sunt „*electroblotting-ul*”, utilizarea vacuumului sau transferul pe bază de capilaritate în prezența tamponelor saline concentrate cu pH neutru.

Membrana este ulterior incubată cu soluția care conține sonda. Pentru a asigura o legare eficientă se practică tratamentul membranei prin încălzire sau prin expunere la lumină UV. După hibridizare, membrana este spălată pentru îndepărtarea excesului de sondă marcată. S-a observat experimental că hibrizii formați între moleculele de ARN imobilizate la nivelul membranei și sondele de tip ARN sunt mult mai stabili decât cei formați cu sondele ADN. Ca atare, condițiile necesare procesului de hibridizare și parametrii etapei de spălare trebuie optimizați ținând cont de tipul de sondă.

Prin *Northern Blotting* putem vizualiza molecule țintă de ARN dintr-o populație heterogenă, respectând condiția să deținem o sondă care să recunoască o regiune mai mare de 20 pb din țintă. Tehnica permite:

- i. examinarea prezenței sau absenței unui ARN specific într-un anumit tip celular.
- ii. determinarea mărimii unui anumit ARNm cu o precizie destul de mare. Acest lucru este foarte util atunci când urmărim punerea în evidență a formelor de *splicing* alternativ pentru produșii de transcripție ai anumitor gene.
- iii. punerea în evidență a intermediarilor de maturare a ARNm și a eventualelor anomalii care pot apărea în cadrul acestui proces.

iv. aprecierea variațiilor cantitative ale unui anumit ARNm la nivelul unui tip celular sau într-o anumită etapă de dezvoltare celulară. Astfel, se poate pune în evidență nivelul particular de expresie al unei anumite gene la nivelul unui țesut, organ, într-un anumit stadiu embrionar sau în cazul unor infecții cu organisme patogene. De asemenea, se poate evidenția modul în care se realizează reglarea expresiei anumitor oncogene sau gene supresoare de tumori în țesuturi normale comparativ cu țesuturile tumorale.

La ora actuală există o bază de date online (*BlotBase*) care pune la dispoziție gratuit rezultatele obținute până acum prin această tehnică la toate tipurile de organisme. Tehnica este treptat înlocuită de noi metode cum ar fi *Real-Time PCR* sau *Microarray*. Cu toate acestea este încă destul de des folosită datorită costurilor scăzute și pentru a confirma rezultatele obținute prin tehnicile menționate mai sus. Marele dezavantaj al metodei sunt etapele laborioase care trebuie parcurse, stabilitatea scăzută a ARN și timpul îndelungat al experimentelor. Un protocol clasic de *Northern Blotting* durează aproximativ trei zile: prima zi pentru electroforeză și transfer, a doua zi pentru prehibridizare și hibridizarea propriu-zisă, iar a treia pentru spălări și vizualizarea benzilor. De asemenea, pentru a evita degradarea ARN țintă în prezența ribonucleazelor toată aparatura necesară și materialele folosite la prepararea soluțiilor trebuie spălate cu apă sterilă tratată cu dietil-pirocarbonat.

O variantă a tehnicii este *Revers-Northern Blotting*. În cazul acesteia moleculele țintă fixate pe membrană sunt reprezentate de ADN, iar sondele de tipuri de ARN extrase din țesuturi și marcate corespunzător.

III.3 Tehnicile *Dot Blotting* și *Slot Blotting*

Aceste două tehnici au apărut din necesitatea analizei rapide a ARN sau ADN dintr-un anumit tip celular. Tehnicile presupun imobilizarea ARN sau ADN total, nefracționat pe

membrane de nylon sau nitroceluloză, urmată de hibridizare în vederea determinării abundenței unor anumite regiuni din structura ADN genomic sau a unor mesageri la nivelul ARN total.

În cazul celor două tehnici sonda este constituită dintr-o secvență de acid nucleic monocatenar (ADN, ADNc, ARN), în timp ce ținta poate fi reprezentată de ADN monocatenar sau ARNm. Datele obținute cu privire la moleculele țintă pot fi atât calitative, cât și cantitative. Acestea pot fi luate în considerare numai în cazurile în care riscul hibridizărilor încrucișate este exclus.

Spre deosebire de tehnicile *Southern* sau *Northern Blotting*, acizii nucleici nu sunt separați prin electroforeză, ci sunt depuși direct pe o membrană de hibridizare, cu ajutorul unui dispozitiv de aspirație, sub formă de punct (*Dot Blotting*) sau de linie (*Slot Blotting*). Astfel, se realizează inițial o serie de diluții dintr-o soluție de ARN sau ADN etalon care se depun pe membrană în formă de linie sau de punct. Diametrele zonelor în care se fac depunerile sunt riguros controlate. În același timp, moleculele țintă izolate inițial se depun în paralel cu diluțiile seriate, pe aceeași membrană. După imobilizarea acizilor nucleici are loc hibridizarea dintre sondă și țintă, intensitatea petelor obținute reflectând concentrația moleculelor de acid nucleic studiate.

Tehnicile sunt utilizate atunci când dorim să comparăm proporția unui anumit tip de ARNm în mai multe tipuri celulare sau în diferite condiții experimentale, când studiem variația proporției de ARNm în diferite stadii de dezvoltare sau diferențiere celulară, când urmărim obținerea de informații cu privire la rolul unor secvențe ADN la nivelul genoamelor sau o evaluare cantitativă a ADN. Ele au avantajul că sunt mai rapide decât *Southern* sau *Northern Blotting*, având o durată de desfășurare cuprinsă între 1 și 3 ore. Totuși, trebuie să fim foarte siguri că sonda este specifică pentru secvența căutată, deoarece în absența unei separări a moleculelor țintă în funcție de mărime există riscul nedecelării hibridizărilor nespecifice. De asemenea, utilizarea ADN sau ARN total, nesupus separărilor electroforetice și a celorlalte etape pregătitoare poate conduce la rezultate imprevizibile la hibridizare, scăderea intensității semnalelor datorită blocării situsurilor de hibridizare sau apariția unor semnale fals pozitive din cauza legării nespecifice a sondelor.

III.4 Tehnica *Western Blotting* (Immunoblotting)

Tehnica permite detecția unor anumite proteine specifice dintr-un amestec. Practic trebuie parcurși mai mulți pași, de la extracția proteinelor din țesut și până la recunoașterea acestora de anticorpi specifici în vederea evidențierii (Figura 50).

Inițial se realizează o extracție de proteine totale din țesutul de interes. Proba proteică este solubilizată prin tratamente cu detergenți sau cu agenți reducători de tipul ditiotreitului (DTT) sau β -mercaptoetanului (2-ME). După solubilizare se realizează o electroforeză în gel de poliacrilamidă, în condiții denaturante, în acest fel separându-se benzile proteice de interes din amestecul total în funcție de mărimea lor. Grosimea gelului de electroforeză nu trebuie să depășească 1mm pentru a se asigura un transfer ulterior eficient. Un dezavantaj al tehnicii este faptul că unii anticorpi folosiți nu recunosc forma denaturată a proteinei antigen de interes și din acest motiv protocoalele experimentale trebuie optimizate riguros.

În a doua etapă se va aplica o membrană specială peste gelul de poliacrilamidă, pentru a asigura transferul proteinelor la nivelul acesteia, întotdeauna sub acțiunea unei diferențe de potențial electric. Membranele poate fi de nitroceluloză, nylon (neutre ori încărcate pozitiv) sau PVDF (difluorură de polivinidilenă). Legarea proteinelor se face atât prin intermediul interacțiilor hidrofobe, cât și prin interacții ionice stabilite între proteine și situsuri specifice de la nivelul membranei. Conținutul tamponului de transfer utilizat poate fi adaptat pentru creșterea eficienței procesului (de exemplu adăugarea de SDS într-o concentrație scăzută conduce la eficientizarea transferului în special pentru proteine cu mase cuprinse între 60 și 90 kD). Adăugarea în exces a SDS în tamponul de transfer poate interfera cu procesul de legare a proteinelor la membrană. Verificarea uniformității transferului se face prin colorare cu *Ponceau Red* sau *Coomasie Blue*.

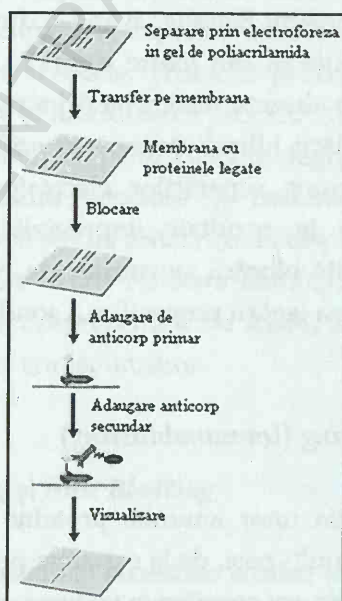


Figura 50. Etapele tehnicii Western Blotting.

În ultima etapă, membrana, care are proteinele legate la suprafața ei, este incubată cu o soluție de anticorpi specifici pentru proteina de interes. Un pas premergător al acestei etape este blocarea tuturor situsurilor active de legare ale membranei (cele rămase libere după transfer) pentru a evita atașarea anticorpilor la nivelul acestora. Blocarea se face prin utilizarea unei largi varietăți de compuși: soluții diluate de albumină serică bovină ori cazeină, lapte praf degresat solubilizat sau soluții de *Tween 20* (*Polyoxyethylene 20 sorbitan monolaurate*). Totuși, selectarea substanțelor cu care se face blocarea nu se face aleator deoarece există riscul unor interferențe asupra rezultatelor finale. De exemplu, soluțiile de cazeină sau laptele praf degresat pot conține cantități adiționale de biotină care vor interfera în eventualele reacții de recunoaștere cu avidina. Prin blocare se evită atașarea nespecifică a anticorpilor la membrană și implicit, obținerea unor rezultate eronate datorate semnalului puternic de fundal. Membranele de nylon, care sunt cel mai des utilizate în *Western Blotting*, necesită condiții de blocare mai stricte.

Vizualizarea benzilor se face de obicei în doi pași. Prima dată are loc legarea unui anticorp primar la proteina de interes. Ulterior se va lega și un anticorp secundar marcat, iar detecția se va realiza cu ajutorul unui substrat cromogen, chemiluminescent sau prin fluorescență (Figura 51). Detecția prin chemiluminescență are câteva avantaje: timp de expunere scurt pentru obținerea semnalului și stabilitate relativă timp de câteva zile. Totuși, în situația vizualizării prin fluorescență sau chemiluminescență există dezavantajul major al prezenței unui semnal de fundal intens care interferă cu benzile de interes.

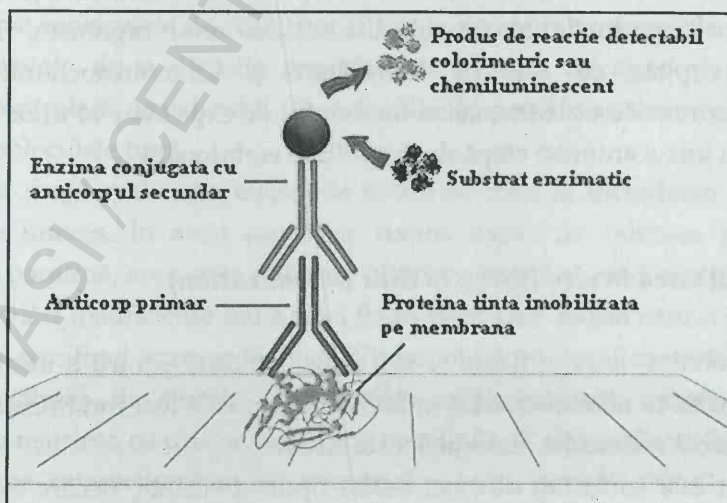


Figura 51. Detecția benzilor proteice țintă în *Western Blotting*.

În cazul detecției cu substrat cromogen, membrana având proteinele legate este tratată cu anticorpul primar, spălată și apoi tratată cu anticorpul secundar legat de fosfataza alcalină sau peroxidază. Legarea enzimelor pe anticorpul secundar se va face direct sau indirect, prin intermediul punții avidină-biotină. Anticorpul secundar va recunoaște complexul format din proteina țintă și anticorpul primar, se va atașa la acesta, iar printr-o reacție enzimatică substratul cromogen sau chemiluminescent va fi modificat vizualizându-se astfel numai benzile de interes. Succesiunea etapelor de lucru pentru un protocol de *Western Blotting* durează aproximativ două zile.

O variantă a tehnicii este *Eastern Blotting*. Aceasta este utilizată pentru analiza modificărilor posttranslaționale ale proteinelor prin folosirea sondelor specifice pentru detecția lipidelor, glucidelor sau a diferitelor tipuri de fosforilări.

III.5 Tehnici de hibridizare *in situ* și imunohistochimie

Sunt tehnici citologice de rutină utilizate în scopul determinării expresiei temporale și spațiale a moleculelor de ARNm (hibridizare *in situ*) sau a diverselor tipuri de proteine (imunohistochimie) la nivelul celulelor individuale, țesuturilor sau chiar a embrionilor. Studiul produșilor de transcripție, dar și al diverselor proteine celulare prin tehnici biochimice și moleculare necesită o cantitate considerabilă de molecule țintă. Aceasta este destul de dificil de obținut din simplul motiv că anumite gene se exprimă numai la nivelul unei minorități dintre celulele unui țesut sau numai pentru o scurtă perioadă în timpul diferențierii unui organism. Tehnicile de microscopie cuplate cu cele de hibridizare și imunohistochimie reprezintă instrumente extrem de utile în analiza modelului de exprimare al unor gene într-un tip celular sau într-o anumită etapă de dezvoltare embrionară.

III.5.1 Hibridizarea *in situ* (ISH - *In Situ Hybridization*)

Inițial, tehnica de hibridizare *in situ* a fost utilizată pentru a localiza secvențe specifice de ADN la nivelul cromozomilor. Ulterior, ea a fost modificată și adaptată pentru localizarea și detecția moleculelor de ARN.

Un țesut este constituit din mai multe tipuri de celule, fiecare exprimând un anumit set de gene. Astfel, două celule adiacente din același țesut pot exprima gene

diferite. Pentru a cunoaște localizarea transcriptului unei anumite gene și pentru a avea mai multe informații despre modul său de exprimare putem apela la tehnica hibridizării *in situ*. Principiul tehnicii constă în folosirea unor sonde specifice ADN sau ARN în vederea identificării unor secvențe țintă complementare de ARNm la nivelul unor eșantioane de țesut.

Prepararea secțiunilor tisulare

Prepararea secțiunilor tisulare în tehnica ISH este un proces extrem de sensibil de care depinde reușita întregului experiment. Secțiunile convenționale (4-6μm) sunt, în mod uzual, preferate de practicieni. Secțiunile mai groase au ca principal dezavantaj dificultatea interpretării semnalelor, deoarece acestea apar în mai multe planuri focale. De asemenea ele vor conține nuclei trunchiați, în care semnalele fluorescente sunt pierdute iar modificările de la nivelul cromozomilor vor fi dificil de detectat.

Pentru realizarea practică a tehnicii, țesutul sau organul este mai întâi fixat chimic. Cel mai utilizat și mai eficient fixator chimic este paraformaldehida (PFA). Etapa de fixare a materialului biologic este una cheie pentru întregul experiment, de reușita acesteia depinzând obținerea unor rezultate corecte. O fixare deficientă poate conduce la obținerea unui semnal foarte slab, la lipsa totală a acestuia sau la apariția unui semnal de fundal foarte puternic. Una dintre cele mai bune fixări ale materialelor biologice se poate realiza cu soluție de paraformaldehidă 4%, la 4°C. Scăderea temperaturii are rolul de încetini procesul de fixare conducând astfel la o mai bună stabilizare a preparatelor. Timpul necesar acestei etape este selectat de cele mai multe ori empiric, pe baza observațiilor experimentale. Totodată, trebuie ținut cont că *in vivo* moleculele de ARN pot fi legate de anumite tipuri de proteine și ca atare este nevoie de o digestie prealabilă a acestora cu ajutorul proteinazelor. Proteoliza controlată are și rolul de a facilita în pasul următor accesul sondelor marcate la moleculele țintă.

Imediat după realizarea etapei de fixare se trece la includerea în parafină a țesutului de interes. În acest pas apar riscuri legate de calitatea procesului de includere în parafină, secțiunile realizate ulterior putând să se dezintegreze datorită unei deshidratări insuficiente sau a unei fixări deficitare. Există câteva mari avantaje ale utilizării parafinei cum ar fi posibilitatea obținerii unor rezultate pe secțiuni seriate, capacitatea de stocare a blocurilor la temperatura camerei pe termen nelimitat sau ușurința cu care se realizează secțiunile. O altă variantă la împarafinare este realizarea criosecțiunilor, iar avantajul acestei metode constă în faptul că

materialul biologic nu este deteriorat prin prelucrare și permite o mai bună identificare a țintei.

Urmează o etapă de demascare, foarte importantă, în care țesutul de analizat este supus tratamentului chimic și/sau termic, în scopul accesibilizării secvențelor nucleare ADN pentru sonde. Majoritatea tehnicilor includ un pas proteolitic care reduce luminozitatea fundalului și intensifica vizibilitatea semnalului emis de sondă.

După acești pași pregătitori, sondele marcate sunt adăugate la secțiune și fixate pe lamele. Acestea sunt apoi încălzite un timp scurt la 70-90°C pentru denaturarea ADN genomic înainte de hibridizarea sondelor, apoi sunt menținute la 45-55°C peste noapte.

Etapa de demascare plus pasul de proteoliză sunt procese esențiale pentru obținerea unor rezultate concludente. Pretratamentul insuficient duce la o hibridizare ineficientă a probelor sau chiar absența ei, iar pretratamentul prelungit poate determina desprinderea secțiunii de pe lamă. Deoarece fixarea și procesarea țesutului de analizat variază de la probă, la probă (uneori chiar pentru probe provenite din aceeași biopsie), unele probe nu dau rezultate satisfăcătoare și procedura trebuie repetată în alte condiții (ex. o demascare prelungită). Calitatea rezultatelor este afectată și de factori precum timpul scurs de la prelevarea biopsiei, mărimea specimenului, parametrii de fixare ai probei, condițiile de depozitare postfixare etc.

Selectarea și marcarea sondelor

Sondele folosite sunt reprezentate în special de molecule de ARN marcate (ribosonde), dar și de molecule de ADN monocatenare. Totuși, este de preferat utilizarea sondelor ARN deoarece, în acest caz, este evitat fenomenul de hibridizare nespecifică printr-un tratament specific cu ribonucleaze. Ribosondele se obțin prin transcripția *in vitro* a catenei complementare a ARNm țintă în prezență de dUTP marcat radioactiv (cu ^{32}P sau ^{35}S) sau chimic. Lungimea optimă pentru sonde este cuprinsă între 30 și 300 de nucleotide. După hibridizare și spălare (necesară pentru îndepărtarea hibridizărilor nespecifice), detecția se face fie prin autoradiografie, fie cu ajutorul anticorpilor antidigoxigenină/antibiotină cuplați cu fosfataza alcalină sau peroxidază. Substratele enzimatică ale acestora sunt 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfatul și nitroblue tetrazoliu pentru fosfatază, respectiv diaminobenzidina pentru peroxidază, iar activitatea enzimatică este detectată prin formarea unui precipitat colorat. Observarea lamelor la microscop permite vizualizarea acestuia și oferă astfel posibilitatea localizării transcriptului.

Tehnica s-a dovedit eficientă pentru studiul genelor reglate în cursul embriogenezei la *Drosophila melanogaster* și a permis delimitarea sectoarelor în care acumularea diferențiată a ARNm determină diferențierea țesuturilor în embrioni.

III.5.2 Tehnica hibridizării fluorescente *in situ* (FISH - Fluorescent In Situ Hybridization)

O altă tehnică mai recentă, dar care a intrat în setul analizelor de rutină pentru stabilirea cariotipului, este hibridizarea fluorescentă *in situ*. Există posibilitatea ca marcarea sondelor pentru hibridizare *in situ* să se facă utilizând marcatori fluorescenți (fluorocromi). Astfel este posibilă vizualizarea simultană a mai multor sonde diferite dacă acestea sunt marcate cu fluorocromi diferiți.

Aplicațiile tehnicii sunt vaste. De exemplu, tratarea nucleilor interfazici cu sonde ADN marcate fluorescent care recunosc secvențe specifice de pe cromozomi conduce la identificarea acestora. Sondele se leagă la secvențele complementare de pe cromozomi, îi marchează specific, și astfel aceștia pot fi vizualizați prin microscopie de fluorescență. Aplicațiile nu se limitează numai la acest aspect. Prin folosirea unor sonde specifice, pentru regiuni bine definite de pe cromozom, FISH servește pentru identificarea microdelețiilor fine și translocărilor complexe care nu pot fi detectate prin tehnici clasice. De asemenea, FISH reprezintă o metodă de cartare a genelor de interes clinic nou identificate. Utilizarea cu succes a sondelor cu lungimi mari face posibilă limitarea la minimum a hibridizărilor nespecifice.

O variantă extinsă a tehnicii FISH, numită *Chromosome Painting*, permite identificarea tuturor cromozomilor unei celule prin folosirea unor seturi de sonde marcate fluorescent care recunosc secvențe particulare de-a lungul acestora. Numărul cromozomilor care pot fi detectați simultan poate fi limitat numai de disponibilitatea coloranților fluorescenți care pot fi excitați la diferite lungimi de undă. De exemplu, tehnica nu poate fi folosită pentru vizualizarea simultană a tuturor celor 46 de cromozomi de la om. Această limită a fost depășită prin introducerea „cariotipului spectral” care presupune folosirea unor combinații de cinci fluorocromi și semnale adecvate controlate de computer. În acest fel este posibilă vizualizarea fluorescentă a tuturor cromozomilor.

Evaluarea rezultatelor în tehnica FISH

Când se evaluează rezultatele FISH, trebuie luați în calcul mai mulți factori: arhitectura țesutului (inclusiv variațiile locale), fixarea țesutului, celularitatea în interiorul secțiunii, frecvența nucleilor trunchiați, natura complexă modificărilor genetice observate.

Pentru evaluarea rezultatelor FISH atenția se va concentra pe zone bogate în celule anormale. Zona complet hibridizată trebuie scanată pentru evidențierea

modificărilor importante pentru diagnostic și prognostic. Detaliile morfologice, prezervarea țesutului și alți factori pot induce variabilitate între secțiuni. De asemenea, trebuie evitate zonele în care limitele nucleilor individuali nu sunt clar identificabile sau unde densitatea celulară este crescută.

Totodată, semnalele FISH trebuie și ele alese. Astfel, se selectează zone cu semnale distincte, intense și clare, cu un fundal de luminozitate scăzută, astfel încât nucleii și sondele să fie vizibili.

Coloranți fluorescenți utilizați la marcarea sondelor în tehnica FISH

În continuare vom enumera câțiva dintre cei mai utilizați fluorocromi în tehnica FISH cu mențiunea că în practică pot fi utilizate sonde marcate cu unul sau mai mulți coloranți diferiți:

1. Fluorescein izotiocianat (FITC) – este unul dintre cei mai utilizați marcatori fluorescenți (Figura 52). Are proprietatea de a fi excitat la lungimi de undă de 495 nm și emite la 521 nm. Marele dezavantaj al acestuia este că fluorescența dispare rapid și ireversibil, deci imaginile trebuie preluate cât mai repede posibil.

2. Tetrametil-rodamin-izotiocianat (TRITC) – este al doilea cel mai utilizat fluorocrom (Figura 52). Excitat la 544 nm emite fluorescent la 572 nm. Intensitatea fluorescenței este mai slabă decât la FITC, dar persistența semnalului este mai îndelungată.

3. Texas Red – folosirea lui oferă mai multe avantaje cum ar fi persistența îndelungată a fluorescenței și intensitatea puternică a semnalului. Este excitat la 596 nm și emite fluorescent la 615 nm.

4. Ficoeritrina – fluorocrom cu proprietăți fluorescente similare cu FITC, este excitat și emite la lungimi de undă aproape identice. Totuși, emisia sa este mai apropiată de galben ceea ce îl face relativ ușor de deosebit de FITC.

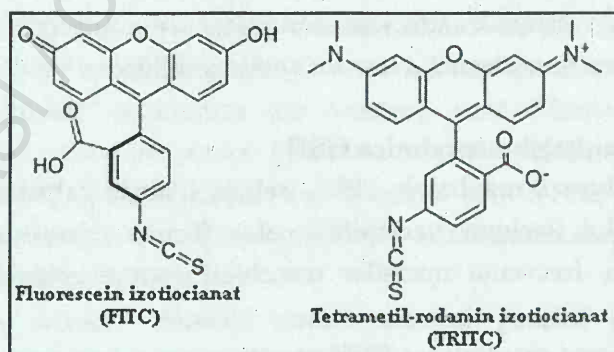


Figura 52. Structurile chimice ale FITC și TRITC.

Prin tehnica FISH este posibilă evidențierea unor secvențe țintă unice, cu un ordin de mărime de 1 Kpb. În raport cu marcarea radioactivă, FISH oferă o rezoluție spațială incomparabil mai bună, fiind posibilă chiar distingerea poziționării marcajului unei gene pe două cromatide pereche. Metoda poate fi folosită și pentru vizualizarea unor secvențe țintă mari cum ar fi cromozomii individuali.

III.6 Tehnica *Microarray*

III.6.1 Analiza acizilor nucleici prin tehnica *Microarray*

Tehnicile clasice de biologie moleculară nu au capacitatea de a realiza evaluări complexe care să implice analiza unui număr foarte mare de gene într-un singur experiment. Tehnica *Microarray* face posibilă investigarea unui număr mare de ținte moleculare (gene, transcripti primari, molecule de ARNm mature etc.) într-o singură reacție, de o manieră rapidă, eficientă și reproductibilă. Aceasta a permis comunității științifice investigarea comparativă a unor procese legate de creșterea, diferențierea și dezvoltarea celulară, dar și de explorarea structurii și modului de funcționare al acizilor nucleici.

Tehnica este utilizată în principal pentru a măsura nivelele de expresie al unui vast număr de gene simultan, în diferite condiții fiziologice. De asemenea, tehnica permite genotiparea unor regiuni de la nivelul genoamelor, identificarea mutațiilor punctiforme, dar și estimarea profilelor de expresie pentru diferite tipuri de ARN precum miARN, siARN (*silencing* ARN) sau lncARN (*Long Non Coding* ARN).

În principiu, un experiment tipic de *Microarray* implică hibridizarea pe bază de complementaritate a unor sonde reprezentate de molecule de ARNm sau ADNc la o catenă țintă de acid nucleic (Figura 53). Cantitatea de sondă legată indică un nivel mai crescut sau mai scăzut al moleculelor țintă din probele respective. Acest proces de hibridizare se desfășoară în suporturi speciale miniaturizate (microcipuri) care permit analiza a zeci de mii de ținte într-o singură reacție.

Deci, putem afirma că tehnica are la bază principiul hibridizării moleculare, suporturile pentru acest proces fiind reprezentate de microcipuri la nivelul cărora se găsesc spotate cantități de nivelul picomolilor din secvențele sondă specifice. Tehnica a derivat de la experimentele de *Southern*, respectiv *Northern Blotting*, profitând de noile tehnologii de miniaturizare a suporturilor și spoturilor. Recunoașterea și

legarea sondelor la ținte se face exclusiv pe baza stabilirii punților de hidrogen între bazele azotate complementare, fără niciun alt tip de legături chimice.

După etapa de spălare în care vor fi îndepărtate absolut toate moleculele care nu au manifestat recunoaștere sondă-țintă, la nivelul cipului rămânând doar fragmentele legate prin punți de hidrogen. Ulterior, cu ajutorul unui scanner specific este detectat semnalul fluorescent sau chemiluminescent, semnal a cărui intensitate este corelată cu diversele condiții experimentale cum ar fi cele de hibridizare sau de spălare (temperatură, tărie ionică a tamponurilor folosite etc.). Intensitatea semnalului de la nivelul unui spot este direct proporțională cu cantitatea de țintă atașată la sonda specifică.

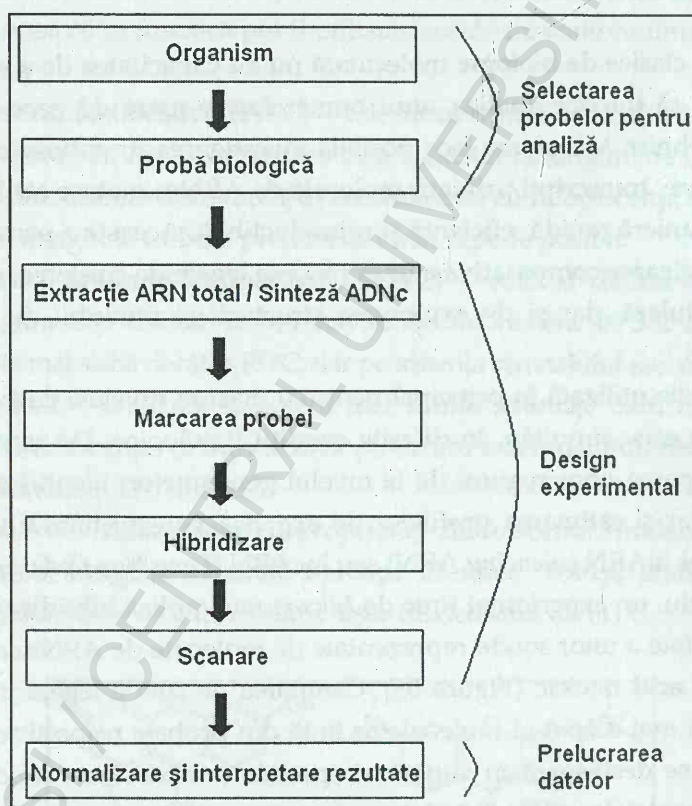


Figura 53. Schema etapelor de realizare a unui experiment de *Microarray*.

Totuși, cuantificarea realizată în *Microarray* este una relativă, intensitatea semnalului unui anumit spot fiind comparată cu intensitatea altuia în condiții fiziologice sau experimentale total diferite. Identitatea secvențelor de la nivelul spoturilor este determinată de poziționarea lor la nivelul cipului.

Microcipurile (Arrays)

Platformele de *Microarray* produse de diferite companii utilizează microcipuri fabricate din diverse materiale, având spotate ținte diferite, într-un număr variabil, de la câteva mii până la câteva zeci de mii. Microcipul este de fapt un dispozitiv miniaturizat la nivelul căruia găsim secvențele țintă de interes.

La ora actuală există două modalități de construcție a microcipurilor. Una folosește sinteza directă a sondelor oligonucleotidice pe suportul solid, cealaltă utilizează spotarea automată a sondelor sintetizate anterior la nivelul suportului cu ajutorul unor dispozitive robotice automate.

Materialele utilizate la fabricarea suporturilor solide variază foarte mult. De exemplu, producătorul Affymetrix utilizează microcipuri realizate din sticlă, mase plastice sau silicon tratate la suprafață cu matrixuri de epoxy-silan, amino-silan, polilizină sau poliacrilamidă. Alte platforme, cum ar fi cele de la Illumina, utilizează sfere microscopice de polistiren care au proprietatea de a lega direct sondele la suprafața lor.

În practică se cunosc două mari tipuri de microcipuri: microcipuri ADNc (*cDNA arrays*) și microcipuri oligonucleotidice (*Oligonucleotide arrays*).

Microcipurile ADNc conțin drept țintă fragmente lungi de ADN având lungimea cuprinsă între câteva sute și până la mii de nucleotide. Acest tip de microcip se sintetizează prin spotare automată iar selectarea țintelor care vor fi spotate pe suport se face fie direct din bazele de date internaționale (ex. GenBank Database), fie de la nivelul unei secvențe de interes. Astfel de microcipuri sunt folosite în experimente de analiză genomică comparativă, analiză funcțională a genoamelor, dar și pentru evidențierea profilelor de expresie ale diferitelor tipuri celulare normale sau patologice.

Microcipurile oligonucleotidice sunt fabricate fie prin spotare, fie prin sinteză directă la suprafața suportului solid. Ele conțin drept molecule țintă fragmente scurte de ADN având lungimi de circa 25 de nucleotide.

Producătorul Affymetrix a dezvoltat un astfel de microcip care conține la nivelul fiecărui spot pe lângă sonda cu secvența oligonucleotidică corectă a țintei (specifică de exemplu pentru un anumit exon) și una cu o secvență modificată prin introducerea unei mutații punctiforme la nivelul unui nucleotid din partea centrală. După etapa de hibridizare, intensitatea semnalului este cuantificată automat folosind diferența dintre intensitatea sondei corecte și a celei modificate. Se consideră că aceste microcipuri sunt superioare celor de tip ADNc datorită calității semnalului și a reproductibilității ridicate.

Sondele

Acestea pot fi reprezentate de molecule specifice de ADN sau ARN având secvențe particularizate în funcție de tipul experimentului în desfășurare. Sondele sunt utilizate pentru a recunoaște și ulterior pentru a hibridiza pe bază de complementaritate cu secvențele țintă care pot fi reprezentate de ADNc, ARN antisens sau alte tipuri de ARN, în condiții de lucru specifice. Hibridizarea sondă-țintă poate fi detectată și cuantificată pe bază de marcarea chemiluminescentă sau fluorescentă.

Din moment ce un microcip poate conține spotate câteva zeci de mii de secvențe, printr-un experiment de *Microarray* se pot efectua mai multe evaluări genetice fie separat, fie în paralel. Pentru îndeplinirea acestui deziderat este foarte importantă pregătirea cipului și a sondelor. Astfel, sondele utilizate au secvențe particulare, de interes pentru ținta urmărită, sintetizate artificial și apoi atașate la suprafețele solide ale cipurilor prin intermediul legăturilor covalente stabilite cu o matrice dispusă sub forma unui strat exterior.

În cazul utilizării microcipurilor spotate, sondele sunt reprezentate de secvențe întregi de ADNc sau de mici fragmente reprezentate de produși PCR. Acestea sunt sintetizate înainte de a fi depozitate la suprafața microcipului unde sunt adăugate treptat, prin spotare. Rețeaua de sonde astfel realizată este gata să recunoască și să lege molecula țintă. Acest tip de experiment poate fi personalizat foarte ușor în funcție de scopul cercetărilor, putând fi alese secvența sondelor, modul de dispunere al acestora la nivelul suprafeței solide, dar și modul de marcarea al lor (*In-House Spotted Microarray*).

În cazul *Microarray* cu cipuri oligonucleotidice, sondele sunt reprezentate de secvențe scurte concepute să recunoască doar o mică parte din molecula țintă de interes, sintetizate direct la suprafața solidă a cipului. Lungimea acestora depinde de scopul experimentelor și variază între 25 și 50 de nucleotide. Sondele lungi sunt mult mai specifice în recunoașterea țintelor, dar sunt mai greu de sintetizat și pot fi dispuse cu o densitate mai scăzută la suprafața cipului.

Variante experimentale

La ora actuală, există două variante experimentale utilizate.

Prima variantă, numită *Two-Channel Microarray* (*Two Color Microarray*), folosește doi coloranți fluorescenți pentru a distinge între două tipuri diferite de probă (ex. două tipuri celulare, țesut normal și țesut tumoral, celule control și celule tratate în diferite condiții etc.). Cei mai utilizați fluorocromi sunt Cy3 (maxim de

emisie la 570 nm) și Cy5 (maxim de emisie la 670 nm), aceștia având maxime de absorbție și de excitație diferite. Cele două tipuri de probă (reprezentate de ADNc) sunt marcate cu cei doi coloranți diferiți, amestecate și analizate la nivelul unui singur microcip. După scanare, în funcție de intensitatea relativă a semnalului fluorescent preluat de la cei doi fluorocromi, se pot identifica genele supra- sau subexprimate.

Cea de-a doua variantă, numită *Single-Channel Microarray (One Color Microarray)*, folosește un singur colorant fluorescent și ne poate oferi informații privind nivelul absolut de expresie al genelor țintă. Informațiile experimentale ne vor indica doar abundența relativă a unei ținte în anumite condiții prin comparare cu aceeași țintă în condiții standard (martor).

Unul din avantajele acestei variante este că prezența unor probe de slabă calitate nu afectează calitatea semnalelor pentru că există un singur colorant, în timp în situația *Two-channel Microarray*, o probă de slabă calitate poate afecta drastic rezultatele finale, chiar dacă cea de-a doua este de foarte bună calitate. Un alt avantaj al variantei este acela că rezultatele obținute după scanarea cipului pot fi stocate cu ușurință și comparate ulterior cu alte prelucrări experimentale.

Design experimental

În cazul oricărui experiment de *Microarray*, pentru realizarea unui design corect al modului în care urmează să se desfășoare cercetările, trebuie să ținem cont de câteva aspecte concrete:

- i. alegerea și designul corect al microcipului pe care urmează să se lucreze;
- ii. selectarea probelor, extracția și prelucrarea acestora;
- iii. marcarea probelor;
- iv. realizarea controalelor biologice;
- v. procedurile și parametrii etapei de hibridizare;
- vi. prelucrarea imaginilor obținute prin scanarea microcipurilor și cuantificarea corectă a spoturilor.

În designul experimentelor de *Microarray* trebuie ținut cont de faptul că fiecare replicat al probelor biologice (ex. minimum două probe de ARN obținute pentru fiecare condiție experimentală în parte) este esențial în obținerea rezultatelor finale. De asemenea, fiecare spot oligonucleotidic de la nivelul cipului trebuie să se regăsească cel puțin în duplicat pentru a asigura eliminarea pe cât posibil a artefactelor experimentale datorate unei slabe hibridizări.

Tocmai datorită acestor probleme, dar și celor cauzate de dotările laboratoarelor sau expertiza cercetătorilor, a fost stabilit un set de reguli denumit MIAME (*Minimum Information About a Microarray Experiment*), adoptat de majoritatea revistelor științifice de prestigiu, care definește un nivel minim de reguli care trebuie respectate când se realizează un astfel de experiment (Brazma et al., 2001).

Prelucrarea datelor

Datele obținute în cadrul unui experiment de *Microarray* sunt într-un număr extrem de mare iar precizia determinărilor este influențată de o serie întreagă de variabile. Analiza statistică a datelor poate fi influențată de o serie de factori dintre care amintim:

- i. analiza imaginii (recunoașterea spoturilor, rezoluția, marcarea zonelor cu semnal de calitate slabă);
- ii. procesarea datelor (eliminarea efectului de fundal, determinarea intensității spoturilor, normalizarea intensităților etc.);
- iii. metodele și modelele statistice aplicate pentru analiza datelor.

Pentru a ușura analiza comparativă a rezultatelor obținute prin *Microarray*, au fost puse la dispoziția comunității științifice o serie întreagă de baze de date cu acces liber (InterMine, BioMart etc.) în care datele obținute pot fi stocate și accesate de orice utilizator, acestea oferind și suport pentru interpretarea analizelor.

Aplicațiile tehnicii *Microarray*

Profilul expresiei genice: în acest caz, țintele sunt reprezentate de molecule de ARNm sau ADNc, iar scopul experimentelor este determinarea și monitorizarea simultană a nivelelor expresiei genice pentru sute sau chiar mii de gene. Expresia acestora poate fi analizată ca urmare a anumitor tratamente la care sunt supuse celulele, în diverse stări patologice sau în diferite stadii de dezvoltare a organismelor.

Hibridizarea genomică comparativă (*Comparative Genomic Hybridization – CGH*): se referă la evaluarea conținutului genic și de secvență al genoamelor din diferite tipuri celulare ale aceluiași organism sau între organisme strâns înrudite.

Identificarea amprentei genetice: utilizând microcipuri de dimensiuni reduse se poate determina amprenta genetică (profilul genetic caracteristic) al diferitelor microorganisme din alimente, furaje sau alte surse biologice. Astfel, combinând tehnicile *Microarray* și PCR pot fi identificate organismele modificate genetic sau a bacteriile patogene ori potențial patogene.

Imunoprecipitarea cromatinei (ChIP): secvențele de ADN au proprietatea de a se lega la tipuri particulare de proteine ce pot fi ulterior izolate prin imunoprecipitare. Aceste complexe sunt supuse unui tratament specific pentru eliberarea ADN care ulterior hibridizează prin *Microarray*, ceea ce va permite identificarea situsurilor specifice de legare a proteinelor la ADN de-a lungul întregului genom. Prin astfel de experimente se pot detecta modalitățile de interacție ale histonelor sau ARN polimerazelor cu moleculele de ADN.

Detecția de SNP (Single Nucleotide Polymorphism): mutațiile punctiforme se pot detecta cu ajutorul unor microcipuri particularizate, atât la nivelul indivizilor dintr-o populație, dar și în mod comparativ, între diferite populații. Aplicațiile detecției SNP se pot extinde în domenii precum analizele de medicină legală/criminalistică, diagnosticul predispoziției genetice pentru anumite maladii, evaluarea profilului mutațional în cancer, analize LOH (*Loss Of Heterozygosity*) sau de *linkage* genetic.

Detecția *splicing*ului alternativ: experimentele de *Exon Junction Array* folosesc sonde specifice pentru situsurile reale sau potențiale de *splicing* pentru anumite gene. Prin intermediul acestei aplicații poate fi detectată expresia formelor de *splicing* alternativ pentru diverse gene sau pot fi identificate situsurile de *splicing* de la nivelul joncțiunilor intron-exon.

Detecția genelor fuzionate: aplicația servește la detecția transcripților fuzionați pentru diverse gene, fenomen întâlnit în diferite tipuri de cancer.

Tiling array: cipurile utilizate în acest caz conțin sonde suprapuse specifice pentru regiunile de ADN genomic înalt compactate, în unele cazuri pentru cromozomi întregi. Scopul aplicației este obținerea de informații calitative cu privire la existența expresiei unor transcripți sau a unor forme de *splicing* alternativ.

III.6.2 Analiza proteinelor prin tehnica *Microarray*

Cu toate că tehnica *Microarray* reprezintă un instrument de bază în biologia moleculară, există și câteva limitări. De exemplu, nivelurile de expresie ale multor gene sunt influențate de mecanisme de reglare posttranscripțională, iar multe proteine sunt supuse modificărilor posttranslaționale cum ar fi fosforilările, glicozilările sau acetilările. O soluție pentru realizarea unei analize complete care să implice și moleculele proteice nou apărute în celule este varianta *Protein Microarray*.

Practic, în cazul acestei variante a tehnicii, cipurile conțin drept ținte cantități mici de proteine, înalt purificate și dispuse la o densitate foarte ridicată. În acest mod

se poate realiza un *screening* complet al proteinelor celulare din punct de vedere al activității lor biochimice sau al interacțiilor de tip proteină-proteină, ADN-proteină, ARN-proteină în care pot fi implicate.

Cel mai important element în cadrul realizării cipurilor de *Protein Microarray* este imobilizarea moleculei sondă la nivelul substratului solid sub forma unui spot omogen sau heterogen. Cel mai frecvent, sondele pot fi reprezentate de anticorpi, peptide ori proteine recombinante sau lizate celulare, în timp ce suportul solid poate fi din sticlă sau din diferite tipuri de geluri cu porozitate mare.

Tehnica *Protein Microarray* are trei variante experimentale: *Analytical Arrays*, *Functional Arrays* și *Microarray în fază inversată*.

În prima variantă sondele sunt reprezentate de cele mai multe ori de anticorpi specifici, iar în a doua variantă de proteine funcționale întregi sau de domenii funcționale ale unor proteine. În cazul celei de-a treia variante, sonda nu este reprezentată de o singură moleculă proteică, ci de totalul moleculelor proteice prezente într-un țesut sau într-o populație de celule la un moment dat.

Detecția recunoașterii sondă-țintă de la nivelul cipului se face prin metode libere de coloranți (microscopie de forță atomică, spectrometrie de masă) sau prin metode clasice care utilizează un marcator și se bazează de obicei pe chemiluminescență.

CAPITOLUL IV

AMPLIFICAREA *IN VITRO* A SECVENȚELOR DE ACIZI NUCLEICI

IV.1 Tehnica PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Tehnica PCR a fost elaborată de către Kary Mullis și echipa sa de cercetători în anul 1985 și este cu siguranță metoda care a cunoscut cea mai rapidă și spectaculoasă dezvoltare din istoria biologiei moleculare. În 1991 a apărut primul număr dintr-o revistă dedicată în exclusivitate acestei tehnici, *PCR - Methods and Applications*, iar lui K. Mullis i-a fost decernat în 1993 Premiul Nobel pentru Chimie. Tehnica a avut un impact major asupra biologiei moleculare și o serie întreagă de interpretări asupra conceptului de bază au dus la introducerea mai multor inovații atât la nivelul etapelor acesteia, cât și la nivelul aparatului utilizat în vederea realizării practice a acesteia.

În spatele unei simplități de principiu și realizare practică, tehnica PCR ascunde numeroase impedimente care pot conduce la rezultate finale eronate. Utilizarea sa presupune înțelegerea logică a etapelor care trebuie parcurse pentru obținerea unor rezultate finale concludente, o dotare corespunzătoare a laboratorului și o experiență practică vastă.

Una dintre proprietățile ADN polimerazelor este că pot sintetiza monocatene *de novo* numai atunci când pornesc de la un primer. *In vivo* acesta este reprezentat de un oligonucleotid ARN complementar sintetizat de o enzimă specifică numită primază care este de fapt o ARN polimerază ADN dependentă. Primerul are rolul de a furniza polimerazelor un capăt 3'-OH liber pentru a putea iniția sinteza de ADN. Această proprietate este indispensabilă stabilității informației genetice. Dacă numai simpla prezență a ADN monocatenar ar fi suficientă pentru realizarea replicării, atunci celulele s-ar confrunta cu o situație gravă în care mai multe secvențe de ADN s-ar sintetiza într-o manieră aleatorie, fără nici un control.

Această proprietate a ADN polimerazelor este utilizată *in vitro*, în tehnica PCR, pentru a amplifica, prin replicări succesive, o secvență de ADN țintă. Pentru punerea în practică este necesară alegerea unor primeri sintetici, capabili să hibridizeze la capetele secvenței de amplificat. Numărul de copii ale secvenței alese pentru amplificare este dublat la fiecare replicare, acesta crescând exponențial cu fiecare ciclu.

IV.1.1 Etapele tehnicii PCR

O reacție de amplificare *in vitro* se realizează în trei etape diferite (Figura 54):

1. **Denaturarea** ADN matriță.
2. **Hibridizarea (anelarea)** primerilor pe bază de complementaritate.
3. **Sinteza (elongarea)** noii catene de ADN având drept matriță catena veche.

În prima etapă are loc de fapt o denaturare termică a macromoleculei de ADN dublucatenar. Astfel, temperatura amestecului de reacție, care conține și ADN, este ridicată până la o valoare care să conducă la ruperea punților de hidrogen stabilite pe bază de complementaritate între cele două catene. La final, în soluție vom regăsi ADN monocatenar.

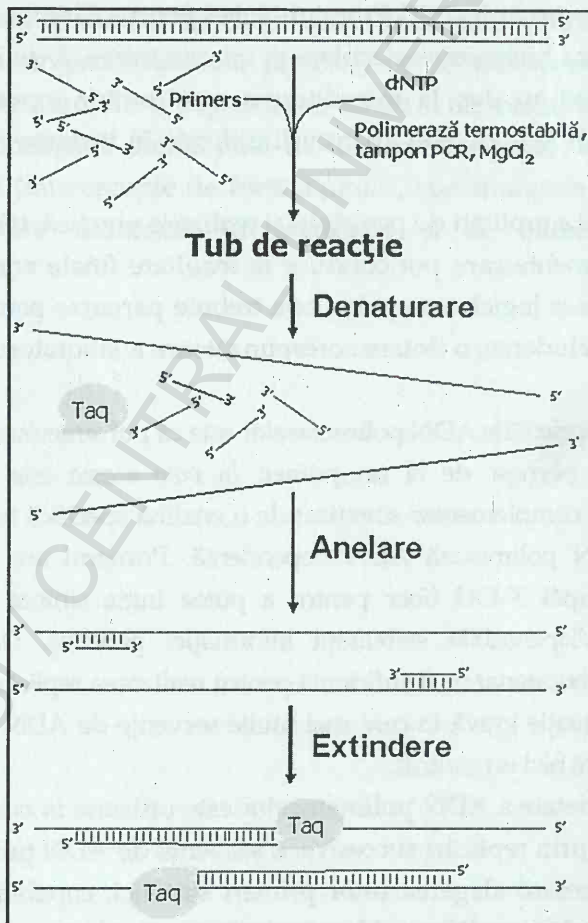


Figura 54. Etapele reacției PCR.

În cea de-a doua etapă are loc legarea primerilor oligonucleotidici sintetici la catena de ADN, pe bază de complementaritate. Temperatura amestecului de reacție este coborâtă la valori care depind de lungimea primerilor și de compoziția lor în nucleotide. Primerii sunt monocatene scurte de ADN, desemnate pe bază de complementaritate cu secvența din ADN de interes. Hibridizarea primerilor se efectuează prin scăderea temperaturii până la o valoare care permite refacerea punților de hidrogen dintre aceștia și catena matriță.

În cea de-a treia etapă are loc sinteza unei noi catene de ADN pornind de la primeri cu ajutorul unei ADN polimeraze și în prezența deoxinucleotid-trifosfaților (dNTP). Acest proces va conduce la obținerea unor noi catene de ADN complementare cu matrița. La finalul acestei etape moleculele de ADN apar sub formă dublucatenară în amestecul de reacție.

Sinteza noilor catene poate fi repetată prin reluarea celor trei etape, iar această repetiție reprezintă intrarea într-un nou ciclu de amplificare. Fiecare catenă nou sintetizată devine matriță pentru noul ciclu de amplificare, astfel încât secvența țintă de ADN este selectiv amplificată în fiecare pas al reacției. Produsul de reacție obținut se numește **amplicon** și va conține la capete secvențele primerilor folosiți la amplificare.

Primii produși rezultați prin copierea catenelor originale au o lungime diferită față de catenele pe care ADN polimeraza le sintetizează în continuare. În al doilea ciclu de amplificare produșii au de asemenea o lungime nedeterminată. Abia din al treilea ciclu de amplificare fragmentele obținute vor avea o lungime definită, corespunzătoare poziției primerilor, respectiv distanței dintre aceștia. Odată cu cel de-al patrulea ciclu, numărul de copii al secvenței țintă de interes va crește exponențial.

Ecuația care definește numărul de copii din amestecul final de reacție este prezentată mai jos:

$$(2^n - Z) \times Y \text{ copii ale secvenței țintă,}$$

unde n este numărul de cicluri de amplificare, Z reprezintă produșii cu lungime nedefinită, iar Y numărul de copii al secvenței originale.

Este de remarcat faptul că în practică, după un număr finit de cicluri de amplificare, acumularea produșilor de reacție intră într-o fază de platou. Deci, procesul foarte eficient de amplificare nu este chiar nelimitat, existând o serie întreagă de factori care fac ca randamentul acestuia să nu fie maxim.

Astfel, după circa 40-45 de cicluri de amplificare, cantitatea de polimerază activă începe să se diminueze iar valoarea activității enzimatice totale suferă o scădere, în special datorită denaturării termice. Un alt factor limitant este și rehibridizarea catenelor matriță cu o viteză mai mare atunci când concentrația ampliconilor depășește un anumit prag, conducând astfel la scăderea eficienței de hibridizare a primerilor. De asemenea, după 40-45 de cicluri are loc și scăderea concentrației de dNTP și diminuarea eficienței tamponului de reacție. Toți acești factori vor conduce la un declin accentuat al acumulării de ampliconi și la intrarea într-o fază staționară, de platou, a reacției PCR.

IV.1.2 Componentele unei reacții PCR

Rezultatele amplificării prin tehnica PCR sunt dependente de mai multe componente care se adaugă de la început în amestecul de reacție. Cantitatea și concentrația optimă a acestora este determinată experimental.

1. Matrița: poate fi reprezentată de fragmente de ADN, ADN genomic sau ADNc. Modul în care sunt pregătite probele pentru reacția PCR poate face diferența între obținerea unor rezultate bune sau lipsa totală a amplificării. Atunci când pregătim proba trebuie să avem în vedere două aspecte extrem de importante: obținerea unei cantități suficiente de ADN și eliminarea oricăror substanțe potențial inhibitoare ale reacției de amplificare. De asemenea, la fel de importantă este și sursa biologică din care se realizează extracția și izolarea matriței. Spre exemplu, atunci când se extrage ADN dintr-o probă inclusă în parafină pot apărea fragmentări ale materialului genetic în timpul procedeeleor de includere în parafină. În cazul matrițelor ADNc, provenite din ARN, este foarte important modul în care materialul biologic din care s-a realizat extracția a fost prelevat, stocat și manipulat și totodată, modul în care ARN extras a fost conservat, datorită mării fragilități a acestui tip de acid nucleic. Probele de ARN trebuie să fie libere de ribonucleaze și se pot stoca pe termen lung exclusiv la temperaturi de -80°C .

2. Tamponul de reacție și clorura de magneziu: majoritatea tampoanelor de reacție sunt furnizate sub formă concentrată fiind necesară diluarea lor înainte de utilizare. Tampoanele de reacție au următoarele roluri într-o amplificare prin tehnica PCR: mențin stabilă valoarea de pH în amestecul de reacție, protejează ADN polimeraza de scăderea prematură a activității enzimatice, minimizează efectul eventualelor inhibitori și stabilizează matrița. Rolul tamponului de reacție este extrem

de important și datorită faptului că activitatea enzimatică a ADN polimerazelor este optimă într-un domeniu foarte îngust de pH, iar orice modificare, chiar și minoră, în afara limitelor acestuia poate conduce la scăderea puternică a amplificării.

În practică se utilizează mai multe tipuri de tamponale ale căror componente variază în funcție de tipul de polimerază utilizat. Cel mai comun tampon folosit conține TRIS-HCl (pH 8,3), clorură de potasiu și gelatină. Tamponalele de reacție pot include sau nu clorură de magneziu. Dacă aceasta nu este inclusă în tampon trebuie adăugată obligatoriu, separat, în amestecul de reacție. Prezența ionilor de magneziu este extrem de importantă deoarece ei sunt activatori ai ADN polimerazei, optimizează temperatura de topire a ADN dublu catenar și facilitează interacția primer-matriță. Cantitățile insuficiente de ioni bivalenți de magneziu duc la amplificări slabe, iar cantitățile crescute conduc la apariția de produși de amplificare nespecfici.

3. Deoxinucleotid-trifosfații (dNTP): sunt livrați fie sub forma a patru soluții stoc individuale, fie sub formă de amestec. Soluțiile sunt ajustate la o valoare optimă de pH. Concentrațiile optime de dNTP introduse în reacție depind de mai mulți factori cum ar fi concentrația de clorură de magneziu, concentrația primerilor, lungimea fragmentului care urmează să fie amplificat și numărul de cicluri de reacție.

În optimizarea unei reacții de amplificare PCR concentrația de dNTP este determinată empiric. Concentrații crescute de dNTP pot inhiba ADN polimeraza, iar concentrațiile scăzute conduc la obținerea unei fidelități mai mari a reacției. De obicei, concentrația optimă de nucleotide este situată în jurul valorii de 200 μM /amestec de reacție. Această valoare este suficientă pentru a sintetiza aproximativ 12,5 μg ADN atunci când jumătate dintre nucleotide sunt încorporate în noile catene (Gerstein S.A., 2001). În anumite scopuri se pot utiliza deoxinucleotide marcate fluorescent sau radioactiv.

4. ADN polimeraza: la realizarea reacției PCR s-a folosit inițial fragmentul Klenow al ADN polimerazei I din *Escherichia coli*. Ulterior au fost descoperite, izolate, produse la scară industrială și utilizate ADN polimerazele termostabile. În tabelul 1 sunt prezentate principalele caracteristici ale câtorva dintre cele mai importante ADN polimeraze termostabile.

Tabel 1. Principalele proprietăți ale câtorva ADN polimeraze termostabile (după Gerstein S.A., Molecular Biology Problem Solver: A Laboratory Guide, 2001).

Enzima	Activitate 3'-5' exonucleazică	Activitate 5'-3' exonucleazică	Stabilitate termică (minute trecute până la înjumătățirea activității enzimatice)	Viteza de sinteză a noii catene (dNTP/ secundă/ mol)
Taq ADN polimeraza	absentă	prezentă	40 - 60 la 95°C	60 - 150
Tth ADN polimeraza	absentă	prezentă	-	25
Pfu ADN polimeraza (forma nativă sau recombinantă)	prezentă	absentă	1140 la 95°C	60
Tli polimeraza (Vent® Polimeraza)	prezentă	absentă	402 la 95°C	67
Tbr ADN polimeraza (Dynazyme)	absentă	prezentă	150 la 96°C	-
Platinum Pfx	prezentă	absentă	720 la 95°C	100 - 300
Platinum Taq	absentă	prezentă	96 la 95°C	60 - 150
AdvanTaq polimeraza	absentă	absentă	40 la 95°C	40
Mth ADN polimeraza	prezentă	absentă	12 la 75°C	-

Una dintre cele mai importante proprietăți ale ADN polimerazelor este fidelitatea. Aceasta poate fi definită ca fiind abilitatea enzimelor de a încorpora nucleotidul corespunzător pe bază de complementaritate la nivelul noii catene și de a corecta eventualele erori apărute în timpul sintezei. Corectarea incorporărilor greșite se poate realiza exclusiv prin prezența activității 3'-5' exonucleazice (capacitate de corectare - *proofreading*). Conform lui Gerstein S.A., 2001, câteva dintre ADN polimerazele termostabile prezintă următoarele rate de fidelitate exprimate în frecvență a mutațiilor/ perechi de baze/ ciclu de replicare:

$$Pfu (1,3 \times 10^{-6}) > Vent (2,8 \times 10^{-6}) > Taq (8 \times 10^{-6})$$

De menționat că activitatea 3'-5' exonucleazică, responsabilă de repararea greșelilor, poate reduce semnificativ randamentul reacției PCR, mai ales atunci când secvența țintă are o lungime mare. Acest fapt se datorează fenomenului de degradare

a primerilor aflați înaintea sensului de înaintare a enzimei mai ales când intervalul de timp necesar etapei de extindere este crescut.

Câteva dintre principalele polimeraze termostabile utilizate pe scară largă în tehnica PCR sunt descrise în continuare:

i) *Taq/AmpliTaq* ADN polimeraza – a fost izolată din *Thermus aquaticus*, apoi modificată și clonată în *Escherichia coli*. Viteza de sinteză este de 60-150 nucleotide pe secundă la o temperatură optimă de 70-80°C. Enzimele au o activitate 5'-3' exonucleazică care permite înlăturarea nucleotidelor care sunt situate înaintea lanțului nucleotidic aflat în creștere. *AmpliTaq* polimeraza are aceleași proprietăți cu *Taq* polimeraza dar este produsă în *Escherichia coli* prin recombinare genetică. Reproducibilitatea și puritatea acesteia este mult mai mare decât a *Taq* polimerazei simple. Există și o variantă a acestei polimeraze căreia îi lipsește un fragment de 289 de aminoacizi de la capătul N-terminal. Această formă este lipsită de activitate 5'-3' exonucleazică și poate amplifica mai eficient matrițele ADN circulare. De asemenea, este de două ori mai stabilă la temperaturi înalte decât *Taq* polimeraza și acest fapt permite utilizarea ei în amplificarea unor matrițe bogate în GC.

ii) *Vent* ADN polimeraza – a fost izolată din *Thermococcus litoralis*. Enzima este mult mai stabilă decât alte polimeraze și este capabilă să producă ampliconi cu lungimi mari. Posedă și activitate 3'-5' exonucleazică (*proofreading*) ceea ce îi permite înlăturarea bazelor incorrect încorporate. Totuși acest tip de activitate exonucleazică are și dezavantaje putând conduce la degradarea primerilor.

iii) *Pfu* ADN polimeraza – izolată din *Pyrococcus furiosus*, are activitate 5'-3' și 3'-5' exonucleazică și o specificitate de 10 ori mai mare decât *Taq* polimeraza. Este utilizată frecvent în reacțiile de secvențializare.

iv) *Tth* ADN polimeraza – a fost izolată din *Thermus thermophilus*, apoi modificată și clonată în *Escherichia coli*. În prezența ionilor de mangan poate fi utilizată ca reverstranscriptază, iar în prezența ionilor de magneziu își reia activitatea ADN polimerazică. Deci enzima poate fi folosită la obținerea ADNc pornind de la ARN, în același tub de reacție. Pentru asta trebuie adăugați în amestecul de reacție atât ioni de mangan, cât și de magneziu. Ulterior, ionii de mangan trebuie chelatați și inactivați pentru a permite reluarea activității ADN polimerazice a enzimei.

v) *Phusion™ High-Fidelity* ADN polimeraza – enzima a fost obținută prin inginerie genetică. În cazul acesteia, a fost adăugat la polimeraza propriu-zisă (similară cu cea izolată de la genul *Pyrococcus*) un domeniu suplimentar de legare a ADN dublucatenar. Acesta crește afinitatea polimerazei pentru dublul helix ADN,

permițând adiția nucleotidelor cu o viteză crescută. În plus, enzima este capabilă să amplifice cu succes secvențe cu lungimi foarte mari.

5. Apă ultrapură: se utilizează exclusiv apă ultrapurificată, liberă de nucleaze. Aceasta se poate obține din apă purificată de tip MilliQ™, care este ulterior sterilizată prin autoclavare.

6. Primerii: desemnarea primerilor este un proces sensibil de care depinde reușita reacției PCR. La alegerea acestora trebuie respectate câteva reguli generale:

i. lungimea optimă a primerilor poate fi cuprinsă între 19 și 28 de nucleotide. Totuși, intervalul de lungime poate fi modificat în funcție de necesități. În acest caz, trebuie să ținem cont că primerii cu lungimi foarte mari (între 28 și 36 de nucleotide) dau specificități foarte bune, dar hibridizează cu o eficiență scăzută, în timp ce primerii scurți (16-18 nucleotide) se vor lega cu randamente foarte crescute la matriță, dar vor genera produși nespecifici de amplificare tocmai datorită acestui fapt.

ii. primerii trebuie să conțină un număr aproximativ egal din cele patru nucleotide, evitându-se pe cât posibil regiunile cu secvență repetitivă. Aceasta va conduce la eliminarea regiunilor cu structuri secundare de tip „ac de păr” (*hairpin*) sau *stem-loop* (Figura 55). Conținutul în GC trebuie să fie cuprins între 40 și 60%, iar repetițiile de guanină sau citozină trebuie evitate.

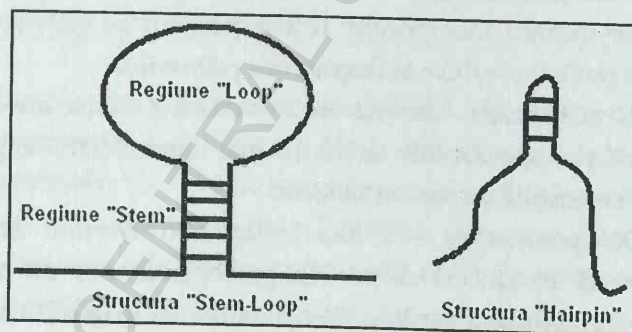


Figura 55. Tipuri de structuri secundare.

iii. perechile de primeri trebuie alese astfel încât să nu prezinte complementaritate la nivel intra- și interindividual, acest lucru permițând reducerea la minimum a posibilelor interacții dintre primeri (ex. dimeri de primeri).

iv. distanța dintre doi primeri la nivelul matriței trebuie să fie mai mică de 5-6 Kpb, dar s-a observat o eficiență foarte scăzută a reacției în cazul în care lungimea produsului de amplificare depășește 3 Kpb.

v. pentru utilizarea primerilor în bune condiții trebuie stabilită cu exactitate temperatura optimă de hibridizare. Acesta se poate determina exclusiv experimental prin realizarea unei reacții PCR în gradient de temperatură.

La final, după desemnarea secvențelor perechilor de primeri, acestea trebuie verificate utilizând aplicația BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) disponibilă pe pagina de internet a NCBI (*National Center for Biotechnology Information* - www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). Aceasta poate identifica automat toate potențialele similarități dintre secvențele stocate în baza de date și secvența desemnată a primerilor.

În practică, se pot folosi în anumite situații primeri degenerați. Aceștia sunt utili atunci când dorim amplificarea unei regiuni necunoscute dintr-o genă cu condiția de a cunoaște secvența genei respective la un organism foarte apropiat din punct de vedere filogenetic. Pentru desemnarea acestor primeri este ideal să deținem informații despre un număr cât mai mare de secvențe de interes de la organisme înrudite filogenetic (ex. specii aparținând unei anumite categorii taxonomice), să le traducem în aminoacizi, dacă este cazul, și apoi să le comparăm. Regiunile înalt conservate în ceea ce privește secvența de aminoacizi pot deveni ținte pentru desemnarea primerilor degenerați. Practic, acești primeri se desemnează în funcție de secvența de aminoacizi codificată (Figura 56).

Secvența proteică							
Met	--Tyr	--Cys	--Asn	--Thr	--Arg	--Pro	--Gly
Codoni posibili							
ATG	TAC	TGT	AAT	ACT	AGA	GCT	GGT
	TAT	TGC	AAC	ACC	AGG	GCC	GGC
				ACA		GCA	GGA
				ACG		GCG	GGG
Primer rezultat							
ATG	TAC	TGT	AAT	ACT	AGA	GCT	GGT
	T	C	C	C	G	C	C
				A		A	A
				G		G	G

Figura 56. Schemă de desemnare a primerilor degenerați.

Există și o reglementare internațională cu privire la folosirea unor prescurtări standard cu privire la nucleotide, prescurtări utilizate la desemnarea secvențelor primerilor degenerați (Tabel 2).

De asemenea, la realizarea unei reacții PCR trebuie să ținem cont de faptul că o concentrație crescută a primerilor poate conduce la formarea produșilor nespecifici de amplificare, mai ales atunci când concentrația matriței este scăzută.

Tabel 2. Prescurtări standard IUPAC pentru diferite combinații de nucleotide.

Prescurtare standard	Nucleotide corespunzătoare
R	G + A
Y	T + C
S	G + C
W	T + A
K	G + T
M	A + C
D	G + T + A
H	T + A + C
B	G + T + C
V	G + A + C
N	G + A + T + C

IV.1.3 Parametri de timp și temperatură

Aparatura necesară efectuării reacției PCR a suferit multe modificări de-a lungul timpului și a fost pretabilă la automatizare abia în momentul introducerii polimerazelor termostabile. La ora actuală se folosesc aparate de PCR total automatizate.

În prima etapă trebuie realizată o denaturare a matriței ADN. Acest proces presupune ridicarea rapidă a temperaturii la 94-96°C pentru o perioadă de timp suficientă, care să permită separarea totală a dublei catene. Temperatura ridicată din timpul etapei de denaturare, repetată la fiecare ciclu de reacție, poate conduce la degradare parțială a matriței și implicit la unele erori de încorporare a nucleotidelor.

În cea de-a doua etapă are loc hibridizarea primerilor. În general, temperaturile de hibridizare variază între 49 și 62°C. O temperatură scăzută generează hibridizări nespecifice și ulterior obținerea unor produși nespecfici de amplificare, iar o temperatură crescută poate duce la absența procesului de anelare. Valoarea de temperatură depinde exclusiv de structura primerilor și de lungimea acestora. Temperatura optimă de hibridizare se stabilește practic printr-o reacție PCR în gradient de temperatură. În această reacție, ADN matriță este hibridizat concomitent la temperaturi diferite cu aceiași primeri, în scopul stabilirii temperaturii optime care să permită eliminarea amplificărilor parazite și realizarea cu un randament maxim a reacției. Totodată, în decursul optimizării pot fi variate și intervalele de timp în care sunt parcurse treptele de temperatură, cât și numărul de cicluri de amplificare.

Etapa a treia, de extensie, se realizează la 70-76°C, care este temperatura optimă de activitate pentru ADN polimerazele termostabile. Timpul necesar acestei etape variază în funcție de lungimea fragmentului care trebuie amplificat. În practică există și o etapă finală de amplificare în care are loc extensia completă a tuturor ampliconilor acumulați.

Numărul optim de cicluri care trebuie parcurse variază între 35 și 45. Un număr mai mare de cicluri este posibil, dar poate conduce la apariția unor erori de amplificare și la acumularea în cantități crescute a produșilor de reacție nespecfici.

IV.1.4 Probleme în realizarea reacției PCR

Principală limită a tehnicii PCR este legată de mărimea secvenței care urmează să fie amplificată. Practica a demonstrat că este foarte dificilă amplificarea unor secvențe mai mari de 3 Kpb. În general, într-o reacție PCR, pot fi amplificate în condiții bune secvențe cu o lungime de maximum 1,5-2,5 Kpb. O altă limită a tehnicii este reprezentată de numărul de copii ale secvenței de amplificat de la care pornim. Dacă în teorie putem porni amplificarea și de la o singură copie, în practică acest lucru este imposibil.

Gradul de eficiență și specificitatea reacției PCR sunt influențate de o serie de componente: profilul termic al ciclurilor de temperatură, concentrația ionilor de magneziu, structura și concentrația primerilor, concentrația de dNTP etc.

Una dintre marile probleme ale tehnicii este contaminarea, aceasta putând conduce la obținerea amplificărilor fals pozitive. Principală sursă de contaminare a matriței este reprezentată de manipulările anterioare ale acesteia. De asemenea, impurificările pot să provină și de la ceilalți reactivi utilizați. Orice contaminare, cât de mică, a unuia dintre reactivii introduși în reacție va conduce aproape sigur la obținerea unor rezultate eronate. O altă sursă de impurificare poate fi reprezentată de materialele folosite în realizarea tehnicii (vârfuri, tuburi, micropipete etc.). Pentru a putea controla problema contaminării este absolut necesară realizarea unui control negativ în care matrița ADN va fi înlocuită cu apă.

Există cazuri în care, în urma procedeele de extracție ale matriței apar impurificări ale acesteia cu diferiți compuși chimici prezenți de la început la nivelul materialului biologic sau care au fost utilizați la izolare. Astfel, substanțe precum heparina, SDS, sarcozilatul de sodiu, citratul de sodiu; fenolul, cloroformul, xilen-cianolul și unele metale grele pot inhiba reacția PCR prin mecanisme diferite. Același

efect îl au și proteinele care rămân legate la nivelul duplexului ADN. În aceste cazuri de contaminare a probelor se pot face tratamente cu adjuvanți, precum albumina serică bovină, care pot îmbunătăți randamentul reacției de amplificare.

O altă problemă a tehnicii este prezența amplificărilor nespecifice datorate hibridizărilor nespecifice ale primerilor. Specificitatea reacției este dependentă de modul în care primerii se leagă de matriță. Primerii care se vor lega la nivelul matriței în mai multe locuri deodată vor conduce la reacții fals pozitive. Acestea sunt imprevizibile și depind de factori cum ar fi secvența primerilor utilizați și de temperatura de hibridizare. De asemenea, lungimea scăzută a primerilor va duce cu siguranță la atașări nespecifice ale acestora, iar modul cel mai eficace de a le elimina este creșterea temperaturii de hibridizare.

IV.2 Variante ale tehnicii PCR

IV.2.1 Hot-Start PCR

Principiul acestei variante constă în adăugarea polimerazei după o primă etapă de denaturare. Această primă etapă este menită să asigure o separare totală a dublei catene, fără a fi afectată ADN polimeraza. Totodată, hibridizarea primerilor și inițierea elongării se vor realiza la temperatura cea mai ridicată posibil, aceasta crescând specificitatea și diminuând legările nespecifice. Temperaturile crescute vor conduce și la eliminarea totală a potențialelor structuri secundare. Totuși, selectarea intervalelor de timp și a valorilor de temperatură trebuie făcută cu precauție deoarece acestea pot conduce la fragmentarea moleculelor de ADN, respectiv ARN matriță, în cazul reacțiilor RT-PCR (PCR Revers-Transcris) realizate într-un singur pas.

La ora actuală există enzime modificate care necesită o etapă obligatorie de activare la începutul reacției PCR. De exemplu, *AmpliTaq Gold* ADN polimeraza necesită pentru activare o etapă de 10 minute la 95°C.

IV.2.2 Nested PCR

Varianta a fost elaborată în vederea eliminării totale a amplificărilor parazite și pentru a avea certitudinea că ampliconul obținut corespunde secvenței de interes.

Tehnica constă în realizarea a două amplificări succesive utilizând cupluri de primeri diferiți, al doilea cuplu încadrând o secvență inclusă în interiorul celei care a fost amplificată cu ajutorul primului cuplu. Astfel, dacă secvența obținută la prima amplificare este un artefact, atunci, la a doua reacție, primerii celui de-al doilea cuplu nu vor putea hibridiza și ca atare nu vom avea amplificare (Figura 57).

De asemenea, acest tip de PCR se poate utiliza în situațiile în care cantitatea de ADN de la care pornim amplificarea este foarte scăzută. În acest caz, după amplificarea cu primul cuplu de primeri vom obține o cantitate de ADN suficient de mare pentru ca cea de-a doua amplificare să poată decurge corect și să se poată obține suficient produs de reacție. Totuși, tehnica nu poate garanta eliminarea totală a amplificărilor nespecifice și necesită desemnarea corectă a celor două cupluri de primeri.

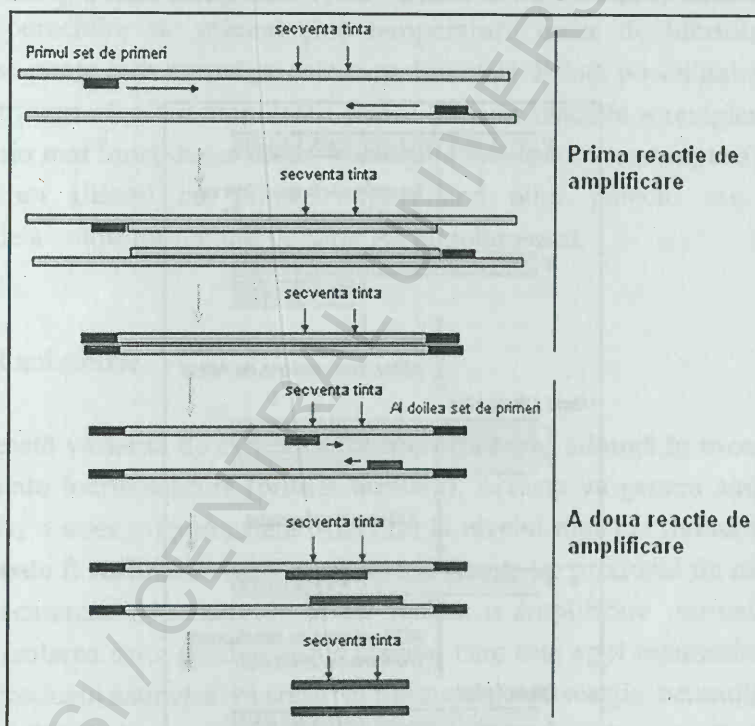


Figura 57. Principiul variantei *Nested* PCR.

IV.2.3 PCR *revers transcris* (RT-PCR)

Tehnica permite punerea în evidență a prezenței moleculelor de ARNm într-un țesut sau organ. Realizarea practică constă în extragerea ARN total din materialul

biologic studiat și copierea moleculelor de ARNm într-un ADN complementar cu ajutorul transcriptazei inverse folosind primeri oligo-dT sau *random-hexamer*. Primerii oligo-dT sunt compuși dintr-o succesiune de deoxitimidină, iar cei *random-hexamer* sunt de fapt o mixtură de oligonucleotide care conține toate combinațiile posibile pentru o anumită secvență hexamerică.

Moleculele de ADN obținute servesc drept matriță pentru o reacție PCR care folosește un cuplu de primeri specifici pentru secvența ADN de interes. În reacție se folosește o ADN polimerază ARN-dependentă. Pentru aceasta, hibridul ARN/ADN obținut în reacția de revers transcriere este supus unei reacții de distrugere a catenei ARN cu ribonuclează sau prin hidroliză alcalină. Ulterior, la monocatena ADN rămasă intactă este atașat un primer complementar cu capătul 3' al acesteia (Figura 58). După sinteza celei de-a doua catene ADN, moleculele sunt supuse unei reacții PCR clasice.

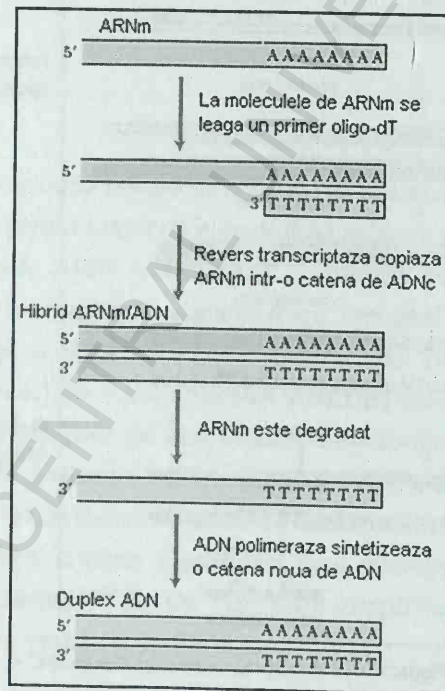


Figura 58. Principiul tehnicii RT-PCR (după Lehninger et al., Principles of Biochemistry, 2004).

Una dintre dificultățile tehnicii este contaminarea preparatelor de ARN cu ADN genomic. Pentru evitarea apariției artefactelor se realizează o decontaminare a ARN cu deoxiribonuclează. Pe de altă parte se pot selecta cupluri de primeri care amplifică secvențe intronice. Astfel, dacă există ADN genomic contaminant,

fragmentul de amplificare obținut va avea o mărime mai mare decât cea a produsului obținut plecând de la RT-PCR.

IV.2.4 PCR multiplex

Varianta a apărut în urma necesității investigării genelor lungi, cu mulți exoni. Tehnica utilizează pentru amplificare mai multe seturi de primeri simultan. Principala problemă care se pune este alegerea seturilor de primeri deoarece este foarte dificilă selectarea mai multor perechi care să aibă aproximativ aceeași temperatură de hibridizare și care să nu formeze dimeri sau structuri secundare. De asemenea, ei trebuie să asigure amplificări eficiente ale tuturor secvențelor țintă. Selectarea perechilor de primeri și a temperaturii unice de hibridizare în PCR multiplex se poate face numai pe cale experimentală. Există posibilitatea ca anumite seturi de primeri să ofere amplificări foarte bune în reacțiile monoplex și, cu toate acestea, să nu mai funcționeze corect în reacțiile multiplex. Acest fapt se poate datora formării unor dimeri cu primerii aparținând altor perechi sau amplificării preferențiale a anumitor regiuni de către ADN polimerază.

IV.2.5 PCR asimetric

În această variantă de PCR unul dintre primeri se adaugă în exces, iar celălalt într-o cantitate foarte scăzută (primer limitant). Aceasta va genera amplificarea, în mod excesiv, a unei singure catene ADN de la nivelul matriței dublucatenare. PCR asimetric poate fi realizat direct pentru orice matriță, iar produsul de reacție este un ADN monocatenar. Alternativ se poate realiza o amplificare normală a matriței urmată de izolarea unui produs dublu catenar care este apoi reamplificat prin PCR asimetric. Produsul asimetric va crește în fiecare ciclu de reacție, acumulându-se într-o cantitate suficient de mare pentru a putea fi folosit în experimente ulterioare.

Dezavantajele metodei se referă la marea variație a reacțiilor posibile ceea ce necesită optimizări îndelungate. De asemenea, obținerea de monocatene ADN nu este întotdeauna foarte eficientă, existând riscul aparițiilor amplificărilor nespecifice.

Pentru a elimina aceste dezavantaje a fost dezvoltată o tehnică PCR specifică denumită LATE-PCR (*Linear After The Exponential PCR*) în care regimul de amplificare virează rapid de la un profil exponențial la unul liniar, în această fază

acumulându-se monocatenene ADN de interes. Pentru a realiza acest lucru se adaugă în exces un primer care va avea o temperatură de hibridizare semnificativ mai scăzută decât cea a primerului limitant.

IV.2.6 *Touch-Down PCR*

Tehnica urmărește eliminarea la maximum a amplificărilor nespecifice. Primerii aleși, protocolul de amplificare și substanțele adăugate în reacție vor conduce la scăderea numărului de amplificări nespecifice. În cazul unei reacții PCR, temperatura de topire a perechii de primeri determină limita superioară a temperaturii lor de hibridizare. Astfel, în acest punct, numai împerecherile specifice dintre nucleotidele primerilor și ADN matriță vor avea loc. La temperaturi mai mici vor apărea și alte împerecheri aleatoare.

Tehnica *Touch-Down PCR* pornește de la temperaturi crescute de hibridizare în primele cicluri, acestea scăzând treptat către sfârșitul reacției. Astfel, în primele cicluri de reacție, la temperaturi crescute, primerii vor hibridiza numai în regiunile unde potrivirea este optimă. Ca urmare, se vor amplifica numai acele secvențe pentru care ei au omologie maximă și pentru care au fost desemnați. Aceste fragmente amplificate în primele cicluri vor servi drept matriță pentru amplificările ulterioare care se realizează la temperaturi mai scăzute. Pentru optimizare se pot folosi diverse substanțe (ex. dimetil-sulfoxidul) care au rolul de a elimina supraîncălzirile ADN care apar în special din zonele bogate în GC. Prin eliminarea acestora se va asigura o mai bună legare a primerilor la matriță.

IV.2.7 *PCR invers*

În foarte multe experimente este necesară amplificarea unor molecule de ADN cu secvență necunoscută. Un asemenea caz este de exemplu cel în care se studiază situsurile la care se inseră în genoame o serie de transpozoni sau genomul unor virusuri. În această situație se poate aplica varianta **PCR invers**. Aceasta permite desfășurarea reacției de amplificare chiar și în cazul în care doar una dintre secvențele terminale de desemnare a primerilor este cunoscută (Figura 59).

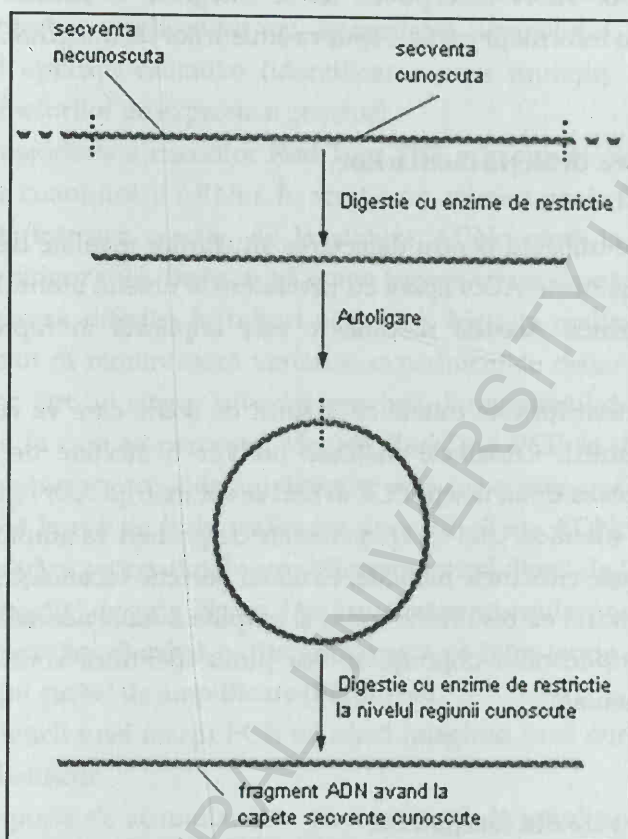


Figura 59. PCR invers.

În momentul în care dorim să aflăm situsul la care un transpozon se inseră în genom se identifică secvența totală sau parțială a acestuia. Apoi se secționează cu endonucleaze de restricție molecula de ADN care cuprinde secvența cunoscută flancată de secvențele necunoscute, aparținând genomului gazdei. Clivarea se realizează în zonele flancante ale secvenței cunoscute. Această moleculă este apoi circularizată și tăiată din nou cu enzime de restricție la nivelul regiunii a cărei secvență este cunoscută (Vassu et al., 2001). Fragmentul dublucatenar liniar rezultat este introdus într-o reacție PCR în care se folosesc primeri complementari cu capetele secvenței cunoscute. Ampliconul rezultat este reprezentat de secvența necunoscută care este de fapt regiunea la nivelul căreia are loc integrarea transpozonului.

Tehnica poate fi aplicată cu succes în studiul transpozonilor, retrovirusurilor și tuturor secvențelor ADN susceptibile să se integreze la nivelul genoamelor, cu condiția de a avea informații parțiale asupra situsurilor de integrare.

IV.2.8 PCR pentru detecția metilărilor

Tehnica este utilizată pentru detectarea situsurilor metilate de la nivelul ADN. Metilarea secvențelor de ADN apare cu precădere la nivelul atomului de carbon din poziția 5 a citozinei. Această modificare este implicată în represia transcripției anumitor gene.

La început matrița este tratată cu bisulfit de sodiu care va converti citozinele nemetilate în uracil. Citozinele metilate nu vor fi afectate de acest tratament. Ulterior, se realizează două reacții PCR având drept matriță ADN modificat, folosind seturi de primeri identice. Una dintre perechile de primeri va amplifica ADN metilat deoarece recunoaște citozinele metilate. Cealaltă pereche recunoaște uracilul rezultat în urma tratamentului cu bisulfit de sodiu și amplifică ADN nemetilat. În acest fel, în urma analizei ampliconilor obținuți, se vor putea identifica zonele din ADN care conțin citozină metilată.

IV.3 Tehnici derivate din reacția PCR

IV.3.1 PCR în timp real (*Real-Time PCR*)

Prin *Real-Time PCR* se realizează concomitent amplificarea și cuantificarea acumulării unei secvențe de ADN țintă. Metoda este folosită în principal pentru detectarea nivelului de expresie al unor gene cu ajutorul moleculelor fluorescente, dar și pentru a detecta prezența unor mutații la nivelul diferitelor regiuni din ADN.

Metodele tradiționale folosesc gelul de agaroză pentru detectarea și caracterizarea produșilor PCR. Această abordare ridică diverse probleme de rezoluție, sensibilitate sau precizie. *Real-Time PCR* este o tehnică mult mai eficientă datorită acurateței cantitative a amplificării și detecției acumulării ampliconului pe parcursul întregii reacții de amplificare. Astfel, proba este monitorizată în timp real și există avantajul că la ora actuală metoda este complet automatizată.

Principiul cuantificării. *Real-Time* PCR înglobează mecanismele de amplificare și detecție într-un singur proces folosind compuși fluorescenți care au capacitatea de a corela concentrația ampliconilor cu intensitatea semnalului luminos. Practic, tehnica are atât aplicații calitative (identificarea unor mutații), cât și cantitative (determinarea nivelurilor de expresie a genelor).

În marea majoritate a cazurilor *Real-Time* PCR este cuplat cu tehnica RT-PCR, pentru realizarea cuantificării ARNm. În acest scop, tehnica poate fi realizată fie într-o singură etapă (întreaga reacție, de la sinteza ADNc până la amplificare, este realizată într-un singur tub), fie în două etape (revers-transcrierea și amplificarea se realizează ca procese diferite, în tuburi separate). Metoda realizată într-o singură etapă are avantajul că minimizează variațiile experimentale deoarece ambele reacții enzimatică au loc într-un singur tub, dar prezintă dezavantajul degradării rapide a matriței ARN de la care se pornește. Metoda *Real-Time* PCR în două etape separă reacțiile de revers-transcriere și de amplificare, ceea ce permite optimizarea cantității de ADNc utilizată în reacție (prin realizarea unor diluții ale ADNc și analizarea lor) și posibilitatea reluării procesului de amplificare pornind direct de la ADNc.

Dinamica reacției de amplificare. Dacă analizăm acumularea de ampliconi într-o reacție PCR observăm că există o diferență marcantă între teorie și practică în ceea ce privește profilul curbei de amplificare (Figura 60).

Analiza cineticii unei reacții PCR ne oferă imaginea unei curbe de amplificare având trei faze distincte:

1) Faza timpurie de acumulare, în care numărul de ampliconi este încă foarte scăzut.

2) Faza de creștere exponențială a numărului de produși de amplificare.

3) Faza de platou, marcată de o încetinire dramatică a producerii ampliconilor datorită unor factori fizici cum ar fi denaturarea ADN polimerazei, scăderea concentrației de dNTP, acumularea în exces a pirofosfatului sau inhibarea reacției de sinteză datorită acumulării în număr mare a catenelor nou sintetizate.

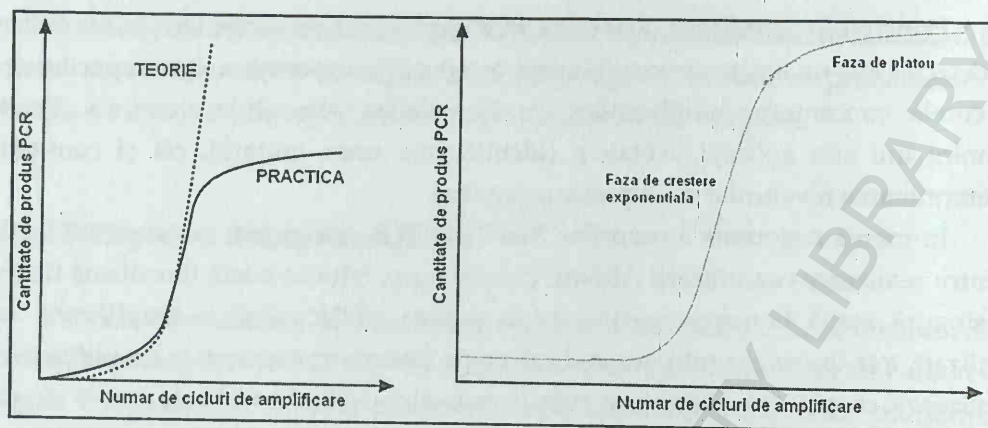


Figura 60. Dinamica unei reacții PCR și fazele de acumulare ale ampliconilor.

În faza timpurie de acumulare, detecția și implicit monitorizarea reacției este imposibilă datorită valorilor scăzute ale fluorescenței. Ciclul de reacție în care valoarea intensității fluorescenței depășește valoarea de fundal și devine detectabilă se numește Threshold Cycle (Ct) și, practic, din acest moment este posibilă monitorizarea reacției PCR. În acest moment reacția intră în faza de creștere exponențială, iar numărul de copii amplificate este cuprins între 10^{10} și 10^{12} . Cu cât numărul de copii din secvența de interes este mai mare, la începutul reacției, cu atât mai puține cicluri de amplificare vor fi necesare pentru a genera numărul minim de ampliconi de la care este posibilă detecția. O cuantificare corectă se obține atât timp cât monitorizarea se face în faza de creștere exponențială. Odată cu intrarea în faza de platou, cuantificarea nu mai este relevantă.

Curba de topire (Melting Curve). Este utilizată pentru evaluarea acurateții cu care s-a desfășurat reacția *Real-Time PCR*. Analiza acesteia este extrem de utilă în caracterizarea produșilor PCR rezultați din reacția de amplificare. Curbele de topire se realizează la finalizarea reacției de amplificare prin creșterea treptată a temperaturii amestecului de reacție, din grad în grad, de la aproximativ 45°C până la 95°C , temperatură la care toate moleculele de ADN prezente în amestec se denaturează. Pe parcursul acestui proces, pe măsură ce dubbele catene se denaturează, coloranții intercalanți prezenți la nivelul acestora vor fi eliberați în soluție.

Este cunoscut faptul că fiecare dublă catenă de ADN prezintă o temperatură de topire (T_m - *Melting Temperature*) unică, care depinde de secvența de nucleotide și de lungimea acesteia. Drept urmare, prin analiza curbei de topire pot fi identificați în primul rând produșii de amplificare nespecifici sau eventualele contaminări cu ADN

genomic. Astfel, dacă în reacția de amplificare s-au format și alți produși nespecfici, pe curba de topire se va observa un număr corespunzător de semnale și nu doar unul singur cum ar fi normal (Figura 61).

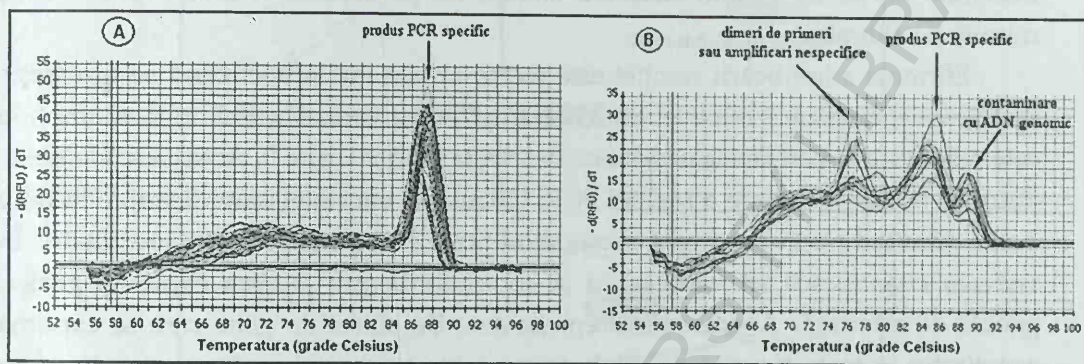


Figura 61. Curbe de topire într-o reacție *Real-Time PCR*. A. Curbă caracteristică unui singur produs de amplificare. B. Curbă specifică prezenței amplificărilor nespecifice și contaminării cu ADN genomic a amestecului de reacție (după Georgescu și Costache, *Lucrări practice – biochimia acizilor nucleici și biologie moleculară*, 2010).

O altă aplicație a curbelor de topire este legată de detecția mutațiilor de la nivelul fragmentului amplificat. Pentru aceasta este necesar să lucrăm cu sonde marcate fluorescent. Acestea sunt desemnate astfel încât să se lege în zona în care probabilitatea de a exista mutația de interes este cea mai mare. Practic, în prezența mutației punctiforme, omologia dintre sondă și țintă nu va fi perfectă și ca atare, duplexul se va destabiliza la o temperatură mai scăzută decât în cazul unei omologii complete, omologie prezentă numai atunci când secvența țintă nu este modificată. Deci, un posibil SNP la nivelul fragmentului amplificat va conduce la obținerea mai multor semnale la nivelul curbei de topire.

O metodă nou dezvoltată, numită topire de înaltă rezoluție (*High Resolution Melting*), este utilizată pentru identificarea diferențelor de secvență nucleotidică care apar între indivizii homo- și heterozigoți. Pentru aceasta se folosesc în loc de sonde marcate, coloranți fluorescenți intercalanți înalt saturați. În prezența acestora, duplexurile caracteristice heterozigoților se vor separa la temperaturi mai scăzute decât cele specifice homozigoților. Aceste diferențe se vor putea vizualiza la nivelul curbelor de topire realizate la intervale de temperatură de sub 1 grad Celsius. Chiar dacă diferențele de temperatură dintre punctele de topire ale dublurilor catene sunt extrem de mici, rezoluția aparatelor și sistemele extrem de performante de detecție permit decelarea lor.

Strategii de cuantificare. Există două modalități de cuantificare – absolută și relativă. *Cuantificarea absolută* folosește standarde diluate seriat pentru a genera o curbă standard. În cazul cuantificării relative modificările expresiei genice sunt măsurate fie pe baza unui standard extern, fie pe baza unei probe de referință, numită și calibrator.

Eficiența amplificării reacției este foarte importantă atunci când se urmărește realizarea cuantificării relative. Eficiența amplificării variază astfel: în faza timpurie este relativ stabilă, în fazele următoare descrește gradual către 0. Această scădere este datorată inhibării în timp a reacției PCR. Calcularea eficienței amplificării folosind o curbă standard nu înregistrează aceste modificări și poate supraestima rezultatul. În vederea cuantificării se folosesc, ca și controale pentru analiza expresiei genice, genele de referință. Acestea sunt reprezentate de obicei de gene care se exprimă constitutiv în toate tipurile de celule (*gene house keeping*) și a căror expresie nu se modifică marcant în diversele tipuri celulare sau în diferite condiții fiziologice. La folosirea unor astfel de gene pentru normalizare apare necesitatea validării stabilității expresiei lor.

Modalități de detecție a produșilor amplificați. Există mai multe alternative tehnice disponibile care permit detectarea produșilor amplificați cu mare sensibilitate. Acestea pot fi directe, atunci când utilizează coloranți fluorescenți intercalanți, sau indirecte, când utilizează diferite tipuri de sonde marcate. Practic, metodele de detecție utilizate trebuie să certifice că intensitatea fluorescenței detectate este direct proporțională cu cantitatea de produs PCR care se acumulează în amestecul de reacție. Astfel, procesele de amplificare și detecție sunt combinate și este posibilă monitorizarea reacției PCR.

- *Coloranți fluorescenți intercalanți* – se folosesc compuși de tipul SYBR-Green care posedă o proprietate specială. Atunci când sunt liberi în soluție prezintă un nivel scăzut de fluorescență, dar în momentul în care sunt încorporați la nivelul unei duble catene ADN, intensitatea fluorescenței lor crește de până la 200 de ori. Din această cauză, cu cât mai mulți ampliconi sunt formați în urma reacției PCR, cu atât mai mulți coloranți vor fi intercalați la nivelul dublelor catene formate și cu atât intensitatea fluorescenței va crește (Figura 62).

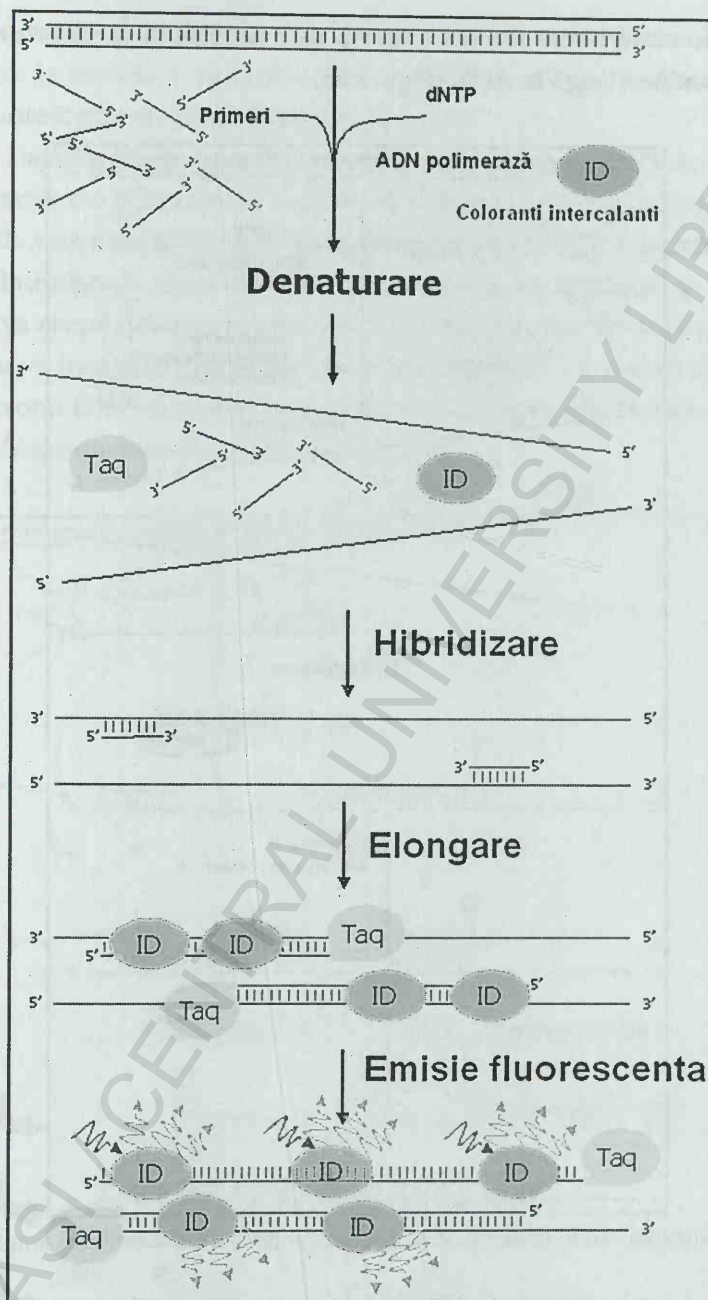


Figura 62. Detecția produșilor de amplificare utilizând fluorocromi intercalanți.

- Sonde "Molecular Beacon" – în acest caz se lucrează cu sonde ADN care formează structuri de tip tijă-bucă (stem-loop), regiunea buclă (loop) fiind complementară cu molecula de acid nucleic țintă. Sondele au atașate la capete

fluorocromi. În stare liberă fluorescența nu este decelabilă ea devenind detectabilă atunci când sonda se leagă la ADN (Figura 63).

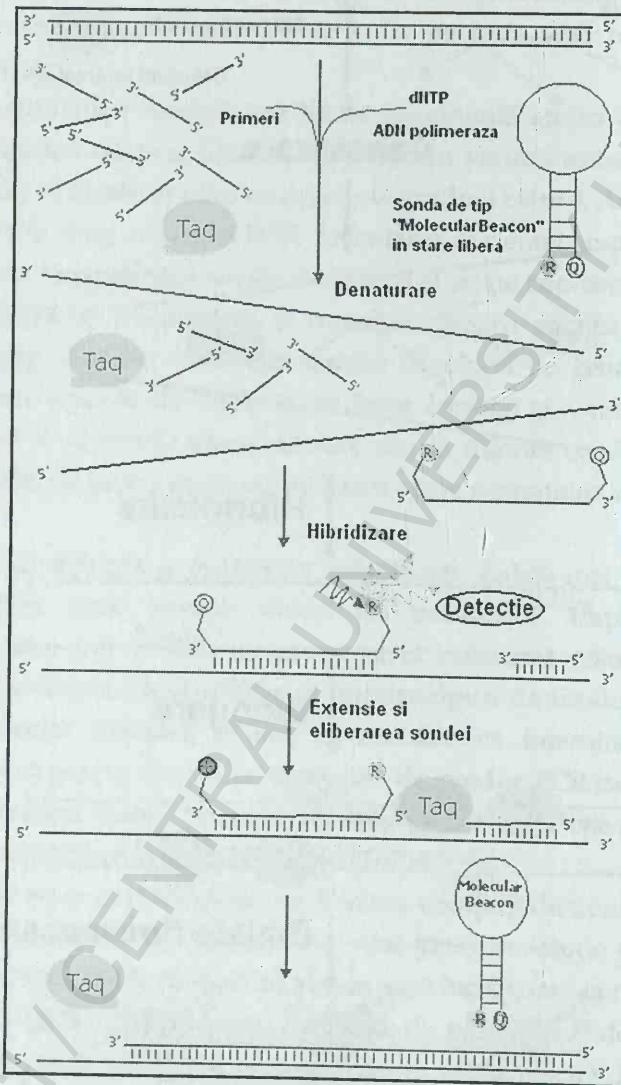


Figura 63. Utilizarea sondelor de tip Molecular Beacon pentru monitorizarea amplificării PCR.

O astfel de sondă are aproximativ 25 pb, dintre care cele situate la mijloc sunt complementare cu matrița ADN, iar cele de la margini prezintă complementaritate una față de cealaltă. În structura sondei întâlnim patru regiuni distincte: o regiune *loop* complementară cu secvența ADN țintă, o regiune *stem* care este reprezentată de capetele complementare sondei, un fluorocrom dispus la capătul 5' terminal care

emite doar atunci când sonda este hibridizată cu ținta și un captator de fluorescență atașat covalent la capătul 3' al sondei care are rolul ca atunci când sonda este liberă să capteze fluorescența emisă de fluorocromul din 5'.

- *Sonde TaqManTM* – în această variantă, sonda este conjugată cu un fluorocrom și cu un captator de fluorescență capabil să absoarbă energia fluorocromului. Atât timp cât sonda este intactă ea nu va emite fluorescență. Odată începută amplificarea, sonda este hidrolizată, fluorocromul este separat de captator și în consecință fluorescența va crește, putând fi detectată. Pe măsură ce reacția avansează, semnalul fluorescent se va intensifica deoarece vor exista în mediul de reacție din ce în ce mai mulți fluorocromi liberi care emit semnal luminos (Figura 64). Metoda se bazează pe activitatea 5'-3' exonucleazică a ADN polimerazei.

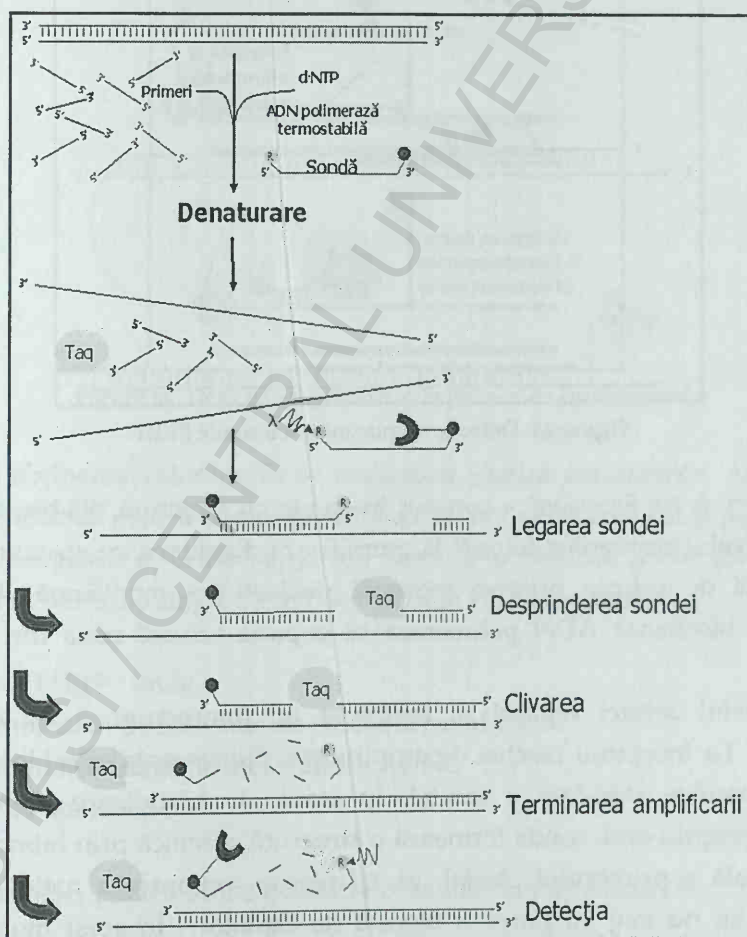


Figura 64. Detectia produșilor de amplificare utilizând sonde TaqManTM.

- **Sonde FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)** – în acest caz se utilizează două sonde, prima fiind marcată la capătul 5' cu un fluorocrom donator, iar a doua cu un fluorocrom acceptor. Când cei doi fluorocromi sunt în vecinătate (la o distanță de 1-5 nucleotide), lumina emisă de fluorocromul donator va excita fluorocromul acceptor, care va emite puternic (Figura 65). Emisia e detectată în faza de atașare și în prima parte a etapei de elongare. După fiecare ciclu PCR se atașează din ce în ce mai multe sonde, rezultând un semnal fluorescent din ce în ce mai intens.

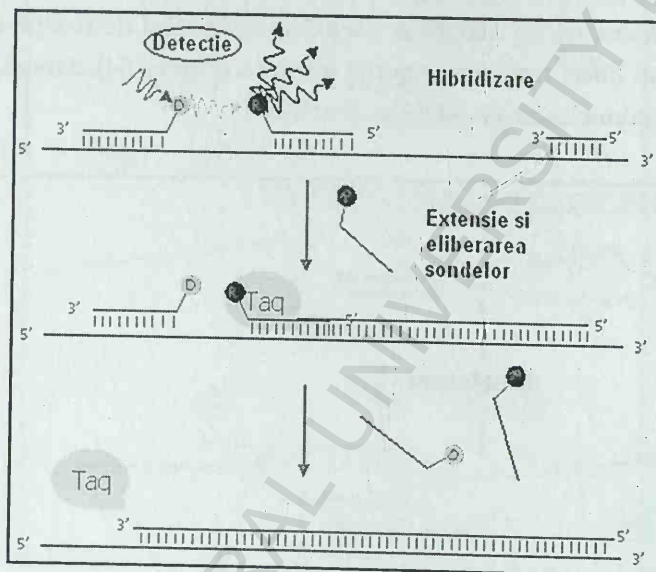


Figura 65. Detecția ampliconilor cu sonde FRET.

- **Primeri de tip Scorpion®** – constau în sonde cu structură tijă-bucă (stem-loop) atașate la nivelul primerilor folosiți la amplificare. Regiunea cu structură stem-loop este separată de primer printr-o secvență nucleotidică modificată chimic (PCR blocker) care blochează ADN polimeraza să copieze această zonă din compoziția sondei.

La nivelul acestei regiuni se regăsește un fluorocrom și un captator de fluorescență. La începutul reacției de amplificare, fluorescența este blocată datorită structurii specifice stem-loop a sondei. În etapa de hibridizare a primerilor și amplificare propriu-zisă, sonda formează o structură specifică prin hibridizarea cu o regiune distală a primerului. Astfel, ea își pierde conformația nativă, iar emisia fluorocromului nu mai va putea fi blocată de captator. În acest moment emisia sondei va deveni vizibilă, putând fi captată și cuantificată (Figura 66).

Estimarea nivelului de expresie al unei gene prin utilizarea coloranților intercalanți: După realizarea practică a reacției *Real-Time PCR* se obține curba exponențială de amplificare. Din analiza acesteia se poate calcula valoarea la care apare *Threshold Cycle* (C_t), ciclul la care intensitatea fluorescenței probelor intersectează fluorescența prag. Totodată, cu ajutorul curbei de topire se determină și potențiala contaminare a probelor, prezența dimerilor de primeri și/sau a amplificărilor nespecifice.

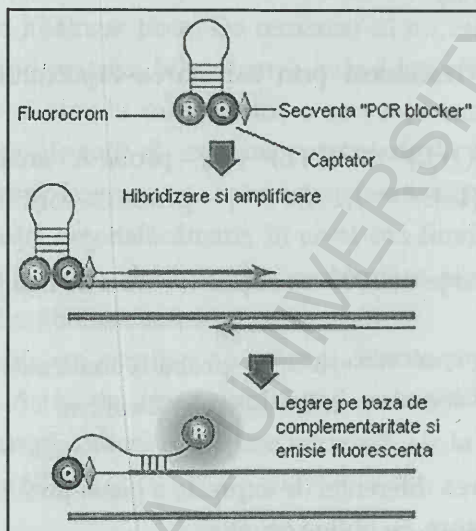


Figura 66. Detecția ampliconilor cu primeri de tip *Scorpion*®.

După obținerea valorilor C_t se realizează analiza rezultatelor. Astfel, se scrie ecuația amplificării pentru fiecare probă, atât pentru gena țintă cât și pentru gena de referință (Georgescu și Costache, 2010). Dacă A reprezintă proba analizată, iar B proba control, pentru o singură genă de referință vom avea ecuația:

$$N_{Ct} = N_o(1+E)^{C_t} \text{ unde,}$$

N_{Ct} = numărul de molecule de ADNc la ciclul C_t ;

N_o = numărul inițial de molecule de ADNc;

E = eficiența reacției PCR.

Prin urmare, pentru probele noastre ecuațiile sunt următoarele:

$$(N_{Ct})_{Aref} = N_{oAref}(1+E)^{C_{tAref}}$$

$$(N_{Ct})_{Bref} = N_{oBref}(1+E)^{C_{tBref}}$$

$$(N_{Ct})_{Atar} = N_{oAtar} (1+E)^{Ct_{Atar}}$$

$$(N_{Ct})_{Btar} = N_{oBtar} (1+E)^{Ct_{Btar}}$$

Deoarece gena de referință este diferită de gena țintă, iar produsul de amplificare are o mărime diferită și va îngloba un număr diferit de molecule de colorant intercalant, cele două valori $(N_{Ct})_{Atar}$ și $(N_{Ct})_{Aref}$ nu sunt egale și se va introduce un factor de corecție notat cu k . Astfel, ecuația devine:

$$(N_{Ct})_{Atar} = k * (N_{Ct})_{Aref}$$

Normalizarea se realizează prin calcularea raportului dintre N_{oTar} și N_{oRef} pentru fiecare probă:

$$N_{oAtar}/N_{oAref} = k * [(1+E)^{Ct_{Aref}} / (1+E)^{Ct_{Atar}}] - \text{proba A - analizată}$$

$$N_{oBtar}/N_{oBref} = k * [(1+E)^{Ct_{Bref}} / (1+E)^{Ct_{Btar}}] - \text{proba B - control}$$

În cazul unei eficiențe de 100% se obține formula de mai jos:

$$N_{oAtar}/N_{oAref} = k * 2^{Ct_{Aref}-Ct_{Atar}} = k * 2^{\Delta Ct} - \text{proba A analizată}$$

$$N_{oBtar}/N_{oBref} = k * 2^{Ct_{Bref}-Ct_{Btar}} = k * 2^{\Delta Ct} - \text{proba B control}$$

Pentru determinarea diferenței de expresie a genei țintă între cele două probe se realizează raportul acestora. Se obține ecuația:

$$\text{probaA}/\text{probaB} = 2^{\Delta \Delta Ct}$$

În cazul unei valori de 1 se consideră că gena are același nivel de expresie în cele două condiții (control și analizat). Pentru o valoare peste 1 gena este supraexprimată în proba A analizată comparativ cu proba B control, iar pentru o valoare sub 1 gena este subexprimată în proba A comparativ cu proba B control (Georgescu și Costache, 2010).

IV.3.2 Tehnica RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

Atunci când dorim să realizăm analiza polimorfismului de la nivelul unor genoame diferite și nu există informații despre unul sau mai mulți markeri ADN dedicați, se poate folosi tehnica RAPD (Polimorfismul amplificării aleatoare a ADN).

Ea permite obținerea rapidă a unor fragmente de ADN de lungimi diferite, mărimea acestora fiind specie specifică.

Principiul de tehnicii este relativ simplu. Este selectată o secvență nucleotidică particulară având o lungime aleatoare (8-12 pb) și se verifică de câte ori aceasta apare la nivelul unui anumit genom. Teoretic, nu pot exista două genoame aparținând unor organisme din specii diferite care să aibă un număr identic dintr-o astfel de secvență. Pentru punerea în practică, sunt desemnați primeri oligonucleotidici scurți, corespunzători secvenței selectate, care vor hibridiza la nivelul ADN matriță la întâmplare, de câte ori întâlnesc ținta. De remarcat că nu este necesară cunoașterea nici unui detaliu privind matrița, hibridizarea având loc efectiv aleator acolo unde primerii întâlnesc pur și simplu întâmplător o secvență complementară. Din acest motiv, metoda nu este afectată de calitatea probei de la care se pornește, ADN putând fi chiar și puternic fragmentat. Totuși, este foarte posibil ca primerii selectați să conducă la amplificări nesatisfăcătoare, în acest caz fiind necesară testarea altor secvențe oligonucleotidice. De altfel, marea problemă a acestei metode este că nu poate asigura o reproductibilitate satisfăcătoare.

Prođuși de amplificare rezultați au mărimi diferite și pot fi analizați folosind tehnici electroforetice. Astfel, în urma amplificării, primerii legați aleator generează un anumit număr de ampliconi cu o mărime variabilă, iar la electroforeză va apărea un profil diferit (Figura 67).

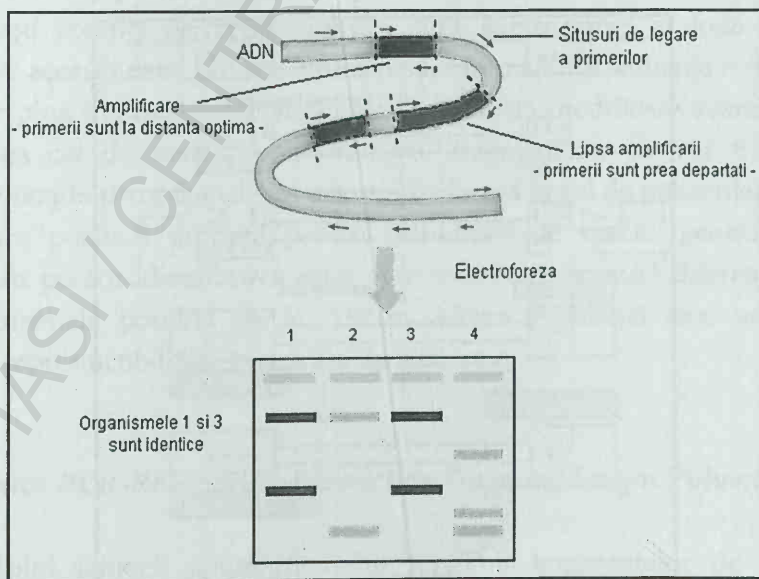


Figura 67. Principiul tehnicii RAPD (după Clark D., Molecular Biology, 2005).

De obicei, pentru un genom complex, sunt desemnați primeri având lungimi de 10-12 nucleotide care să permită amplificarea unui număr limitat de fragmente ADN. Experimental se practică mai multe amplificări succesive ale aceleiași matrițe cu mai mulți primeri având secvențe diferite. Producții rezultați sunt migrați împreună pe același gel de electroforeză pentru a obține o imagine de ansamblu a polimorfismului de amplificare.

Tehnica furnizează o modalitate simplă de discriminare între diferite tulpini bacteriene ale aceluiași gen sau chiar între indivizi diferiți. Totuși, condițiile de preparare a eșantioanelor și parametrii reacției PCR trebuie optimizați permanent. Tehnica este extrem de eficientă în caracterizarea genetică a diferitelor specii de procariote sau eucariote datorită costurilor relativ scăzute.

IV.3.3 Tehnica AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

Tehnica AFLP (Polimorfismul lungimii fragmentelor amplificate) constă în amplificarea selectivă a fragmentelor de restricție generate plecând de la un eșantion de ADN genomic (Vos et al., 1995). Tehnica, descrisă prima dată în 1993, folosește endonucleazele de restricție pentru a cliva ADN genomic, apoi capetele coezive rezultate sunt folosite pentru legarea unor adaptorii specifici cu ajutorul unor ligaze (Figura 68). Practic, se realizează o amplificare selectivă a fragmentelor de restricție rezultate în urma digestiei unui ADN genomic.

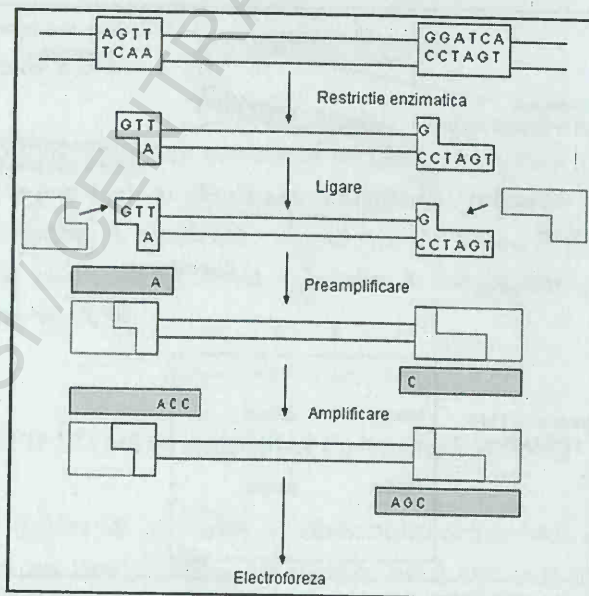


Figura 68. Etapele de realizare ale tehnicii AFLP.

Inițial, are loc generarea unor fragmente de restricție pornind de la ADN genomic sau de la ADNc. Moleculele sunt digerate cu două endonucleaze selectate să acționeze la nivelul unui situs rar (de 6-8 nucleotide) și al unui frecvent (4 nucleotide). Enzima care taie la situsul frecvent are rolul de a genera fragmente scurte, pretabile la amplificare și care au lungimea optimă pentru a fi separate prin electroforeză. Cea care taie la situsul rar este folosită pentru a limita numărul de fragmente amplificabile.

În etapa următoare sunt fixați adaptorii specifici printr-o reacție de ligare la extremitățile fragmentelor de digestie obținute. Adaptorii constau dintr-o regiune dublucatenară miez continuată cu o secvență monocatenară specifică situsului de restricție. Aceasta este necesară dacă se folosesc endonucleaze care generează capete coezive. Ligarea adaptorilor la situsurile de recunoaștere ale endonucleazelor are și rolul de a preveni o a doua reacție de clivare enzimatică. Regiunea miez constă dintr-o secvență cunoscută de ADN de aproximativ 20 pb la nivelul căreia se vor lega primerii.

După ligare se realizează o reacție de preamplificare cu ajutorul unor primeri care hibridizează la nivelul adaptorilor. Prin această reacție vor fi amplificate numai acele fragmente care au capetele modificate. Primerii folosiți sunt desemnați pe baza complementarității cu secvența adaptorului, având în plus un nucleotid, fapt care conduce la un proces de amplificare și mai selectiv al fragmentelor modificate. Se consideră că în această etapă sunt amplificați aproximativ un sfert din produșii de restricție modificați prin adăugarea adaptorilor.

Produșii reacției de preamplificare sunt supuși unei a doua reacții PCR selective. De această dată, primerii utilizați sunt formați din secvența complementară adaptorilor plus trei nucleotide suplimentare, această modificare având același rol, de a scădea cât de mult posibil numărul fragmentelor ce vor fi amplificate. Ampliconii rezultați vor fi analizați prin electroforeză în gel de poliacrilamidă.

Tehnica poate fi utilizată pentru identificări de specie, pentru analize de pedigree sau pentru identificarea unor gene exprimate în mod diferențial, în acest caz experimentele pornind de la ARNm. Marea problemă care se ridică este asigurarea reproductibilității în condiții de laborator.

IV.3.4 Tehnica PCR-RFLP (PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism)

Principiul tehnicii polimorfismului lungimii fragmentelor de restricție se bazează pe compararea profilelor de restricție rezultate în urma digestiei mai multor

produși PCR cu una sau mai multe endonucleaze de restricție. Posibilele mutații care apar la nivelul secvenței ADN pot crea sau distruge un situs de restricție și ca atare vor furniza fragmente de restricție diferite.

Inițial, pentru regiunea din ADN pe care dorim să o analizăm, se identifică posibilele situsuri de restricție, iar apoi se verifică dacă mutațiile de interes afectează vreunul dintre aceste situsuri. Mutațiile pot modifica un situs de restricție deja existent sau pot genera un situs nou. După realizarea reacției PCR, prin care se va amplifica fragmentul de interes, ampliconii vor fi supuși acțiunii enzimelor de restricție. Fragmentele rezultate vor fi analizate prin electroforeză.

Tehnica PCR-RFLP poate fi folosită atât pentru identificarea de mutații, cât și pentru a pune în evidență diferențele care pot apărea între indivizi din specii diferite.

IV.3.5 Tehnica RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)

În momentul construirii băncilor de ADNc, extremitatea 5'-fosfat a secvențelor este adesea absentă deoarece transcriptaza inversă, care începe sinteza de la extremitatea 3' a moleculelor de ARNm, nu poate finaliza sinteza moleculelor de ADNc. Acest fenomen apare în special la copierea transcripturilor foarte lungi, cu un număr mare de exoni. Astfel, informațiile prezente la extremitățile moleculei se pierd.

Din acest motiv a fost pusă la punct tehnica RACE (Amplificare rapidă a capetelor ADNc). Metoda este de fapt un RT-PCR modificat prin care se realizează amplificarea ADNc (pornind de la ARNm) între o secvență definită din moleculă și una dintre extremități (3' sau 5'). Pentru realizarea practică este necesară cunoașterea unei regiuni din interiorul ADNc pentru a putea desemna un primer intern în acea zonă.

Varianta 3' RACE – se bazează pe existența cozii poliadenozină la nivelul tuturor moleculelor de ARNm mature de la eucariote. În acest caz se realizează inițial sinteza catenei ADNc cu ajutorul transcriptazei inverse plecând de la o populație de ARNm izolată. Primerul utilizat pentru funcționarea transcriptazei inverse este de tip oligo-dT. După eliminarea moleculelor de ARN, ADNc este amplificat cu ajutorul unui primer intern poziționat în regiunea 5' și a unui primer ancoră atașat la capătul regiunii politimidină (Figura 69).

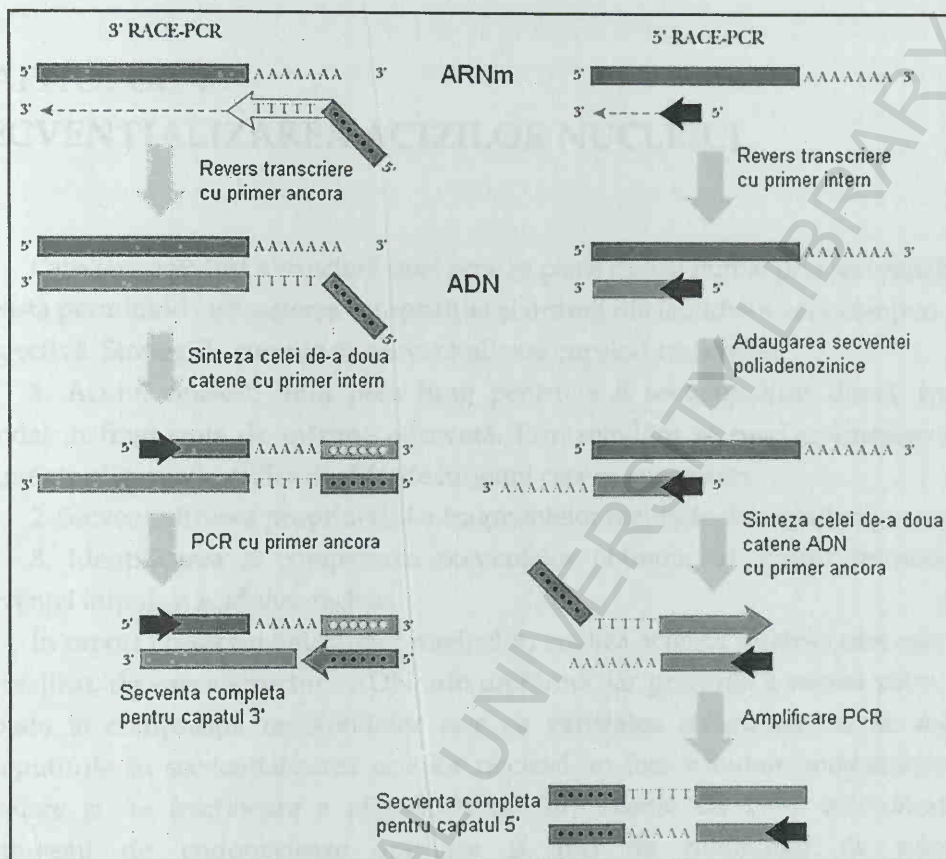


Figura 69. Variantele 3'RACE și 5'RACE.

Cei doi primeri pot fi desemnați astfel încât să conțină la nivelul secvenței situsuri de restricție care să permită inserarea ulterioară a fragmentului de interes în vectorii de clonare.

Varianta 5' RACE – la început, se realizează copierea catenei ARN folosind revers transcriptaza și un primer intern. ADNc obținut este modificat prin fixarea la extremitatea 3' a unui oligonucleotid cu secvență cunoscută, de obicei poliadenozină, cu ajutorul transferazei terminale și a deoxinucleotidelor corespunzătoare. ADNc modificat este apoi amplificat prin PCR cu ajutorul unui primer pentru gena respectivă (primerul intern) și cu a unui complementar zonei poliadenozinice (primerul ancoră). Ampliconul rezultat va conține secvența exactă a extremității 5' a ADNc, respectiv a ARNm de la care s-a pornit inițial (Figura 69). Ampliconul va include deci și secvența de la extremitatea 5' a ADNc.

CAPITOLUL V

SECVENȚIALIZAREA ACIZILOR NUCLEICI

Caracterizarea fină a structurii unei gene se poate realiza numai prin secvențializare, aceasta permițând cunoașterea compoziției și ordinii nucleotidelor care compun gena respectivă. Strategiile curente de secvențializare cuprind trei etape:

1. Acidul nucleic, mult prea lung pentru a fi secvențializat direct, trebuie scindat în fragmente de mărime adecvată. Prin scindare se produc amestecuri de segmente oligonucleotidice de diferite lungimi care se suprapun.
2. Secvențializarea propriu-zisă a fragmentelor rezultate din scindare.
3. Identificarea și compararea secvențelor obținute în scopul reconstituirii secvenței inițiale a acidului nucleic.

În raport cu secvențializarea proteinelor, analiza acizilor nucleici este mai ușor de realizat, deoarece structura ADN este uniformă, iar prezența a numai patru baze azotate în compoziția nucleotidelor face ca varietatea structurală să fie redusă. Începuturile în secvențializarea acizilor nucleici au fost tributare modalităților de scindare și de fracționare a oligonucleotidelor. Înainte de 1970, cercetătorii nu dispuneau de endonucleaze specifice și nici de modalități de scindare. Secvențializarea realizată pentru ARNt pentru alanină a constat în scindarea parțială a moleculei cu ajutorul ribonucleazelor, suprapunerea fragmentelor obținute și analiza produșilor prin cromatografie. În această situație, pentru a stabili secvența celor 72 de nucleotide ale ARNt^{Ala}, cercetătorilor le-au fost necesari mai mulți ani.

La baza evoluției ulterioare a secvențializării ADN au stat două metode care se bazează pe câteva etape comune. Diferența dintre cele două metode constă în modul de obținere a ansamblurilor de fragmente: una dintre metode se bazează pe scindarea chimică (Metoda Maxam-Gilbert), cealaltă se inspiră din procesul de replicare și se bazează pe tehnica sintezei enzimactice (Metoda Sanger).

V.1 Metoda chimică Maxam și Gilbert

Prin această metodă se determină locația purinelor la nivelul fiecărei monocatene separat, și ulterior, aplicând regula împerecherilor complementare, se

poate determina poziția pirimidinelor, și respectiv întreaga secvență. Într-o altă variantă, se realiza determinarea inițială a poziției bazelor pirimidinice și ulterior a celor purinice.

Metoda de secvențializare chimică cuprinde mai multe etape. Astfel, fragmentul de ADN monocatenar care urmează a fi secvențializat este marcat la una dintre extremități printr-un semnal care va permite detectarea sa (marcare cu fosfor radioactiv ^{32}P). Urmează scindarea acidului nucleic care se realizează în mai multe etape și apoi separarea electroforetică a fragmentelor rezultate.

Scindarea uneia dintre cele patru baze azotate se face prin diferite metode specifice pentru purine sau pirimidine. Specificitatea tăierii este dată de reactivii utilizați și de condițiile de reacție. De exemplu, pentru degradarea bazelor purinice se folosește reacția cu dimetil-sulfat în condiții alcaline. Dimetil-sulfatul metilează adenina în poziție 3, respectiv guanina în poziție 7. Această modificare duce la instabilitatea legăturii N-glicozidice astfel încât, în prezența piperidinei, are loc desprinderea heterociclului bazei azotate. În cazul bazelor pirimidinice, eliminarea se face printr-o reacție cu hidrazina. Aceasta atacă atomii de carbon din pozițiile 4 și 6 deschizând heterociclul pirimidinic. Ulterior, baza azotată este eliminată, deoxiriboza scindată, iar legătura fosfodiesterică corespunzătoare devine sensibilă la hidroliză.

Hidroliza legăturilor fosfodiesterice are loc în regiunile în care au fost eliminate bazele azotate. În final se realizează electroforeza în gel de poliacrilamidă urmată de detectarea fragmentelor și reconstituirea secvenței.

V.2 Metoda Sanger – prima generație de secvențializare

Esența tehnicii de secvențializare propusă de Frederick Sanger și colaboratorii a constituit-o generarea de fragmente a căror lungime era dependentă de ultimul nucleotid din structura secvenței. Colecții de astfel de fragmente au fost generate prin întreruperea controlată a sintezei enzimatică. Această tehnică s-a impus în fața celorlalte tehnici de secvențializare datorită simplității sale. Această împreună cu metoda Maxam-Gilbert sunt denumite la ora actuală drept secvențializarea de primă generație. Cu ajutorul metodei Sanger s-a reușit în 2003 secvențializarea în premieră a genomului uman (*Human Genomic Project*).

Sanger a utilizat inițial ADN polimeraza I bacteriană care sintetizează o copie complementară a catenei matrice ADN utilizând deoxinucleotid-trifosfați. Același procedeu este aplicat pentru patru amestecuri de reacție, corespunzătoare fiecărui tip

de dNTP, în același timp. În toate, ADN polimeraza este folosită pentru a sintetiza catena complementară unei secvențe matriță pornind de la un primer complementar cu unul dintre capetele matriței.

Etaplele parcurse sunt următoarele:

a) Fragmentul care urmează a fi secvențializat este denaturat pentru obținerea de monocatene și adus în contact cu un primer specific. Hibridizarea primerului cu matrița monocatenară permite inițierea acțiunii ADN polimerazei în prezența substratelor nucleotidice.

b) În fiecare dintre cele patru loturi se adăugă o mică cantitate dintr-un 2'-3'dideoxiribonucleotid-trifosfat (ddNTP) diferit, analog cu unul dintre nucleotide (Figura 70). Incorporarea acestui analog în locul unui nucleotid normal blochează alungirea catenei datorită lipsei grupării hidroxil din poziția 3' terminală. Din acest considerent ddNTP au fost denumite molecule terminatoare de catenă. Concentrația lor este optimizată pentru a opri sinteza numai ocazional.

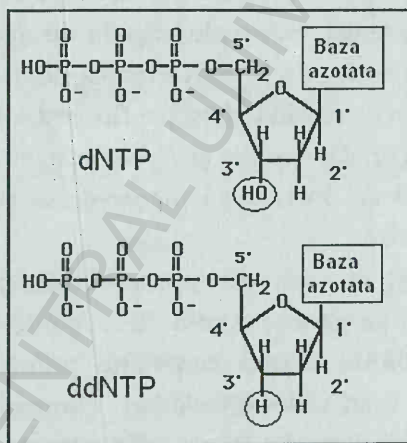


Figura 70. Structura generală a unui dideoxinucleotid.

c) Prin electroforeză în gel de poliacrilamidă sau electroforeză capilară se realizează separarea fragmentelor din cele patru loturi. Mărimea diferită a fragmentelor este datorată opririi copierii catenei matriță la un anumit nivel, corespunzător fiecăruia dintre cele patru tipuri de ddNTP.

Etaapa finală de determinare a secvenței era realizată de Sanger prin autoradiografia gelului, deoarece unul dintre ddNTP introduse în reacție era marcat radioactiv cu ^{32}P sau ^{35}S . Această metodă ingenioasă a permis, în 1977, stabilirea primei secvențe complete de 5386 de baze a bacteriofagului ΦX174 . Total

automatizată ulterior, tehnica a permis descifrarea completă a secvențelor genoamelor multor organisme procariote și eucariote și a fost folosită cu succes în amplul proiect de secvențializare a genomului uman.

Secvențializarea clasică a acizilor nucleici inventată de Sanger are la ora actuală o serie de variante care au făcut-o să se impună ca o alternativă viabilă de determinare a secvenței acizilor nucleici. Toate aceste variante se bazează pe principiul inițial de sinteză de fragmente complementare cu matricea de analizat. Diferențele constau în evoluția spectaculoasă a modalităților de separare și identificare a acestor fragmente.

Detectarea fluorescență reprezintă o alternativă viabilă pentru tehnica autoradiografică. La ora actuală se folosesc primeri sau nucleotid-trifosfați marcați fluorescent a căror separare se realizează prin electroforeză în gel de poliacrilamidă sau prin electroforeză capilară. Marcarea fluorescență oferă posibilitatea combinării amestecurilor de reacție urmată de separarea electroforetică a ansamblului. Inițial, sistemele semiautomate de secvențializare se bazau pe separarea în gel și apoi pe citirea automată a fluorescenței. Sistemele actuale de analiză automată utilizează electroforeza capilară și detecția prin LASER a marcajelor fluorescente.

Pentru secvențializarea folosind detecția fluorescență au fost utilizate două variante ale metodei Sanger: *Dye-primer* și *Dye-terminator*. Dintre acestea, varianta *dye-terminator* este folosită cel mai uzual, deoarece se pretează mai bine pentru sistemele automate de analiză.

Varianta *Dye-primer*: în acest caz primerul sens folosit pentru reacția de secvențializare este marcat cu un fluorocrom. Reacția este ulterior realizată în patru tuburi separate, fiecare dintre acestea conținând primerul marcat cu o culoare diferită, în prezența câte unui dideoxinucleotid. Urmează o amplificare PCR, iar produșii celor patru reacții sunt denaturați și analizați pe gel de poliacrilamidă (Figura 71).

Fluorescența marcatorilor este detectată cu ajutorul unui cititor laser automat, iar datele obținute sunt prelucrate pe computer. În final se obține cromatograma corespunzătoare secvenței analizate.

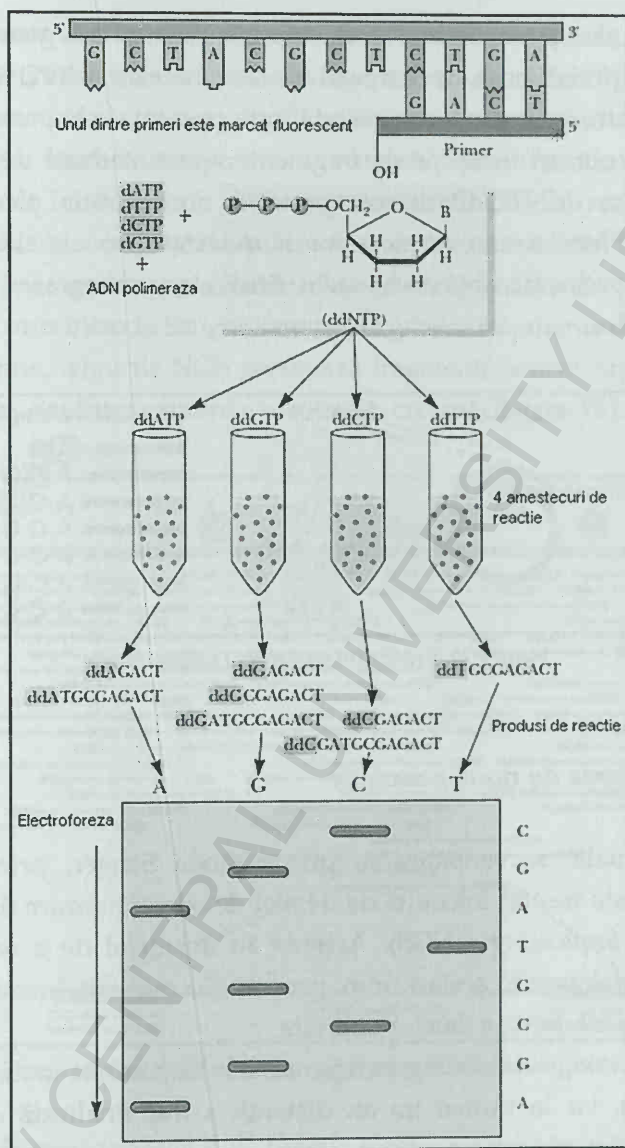


Figura 71. Principiul variantei *Dye-primer* (după Garrett și Grisham, Biochemistry, 2005).

Variantă „Dye-terminator”: în acest caz ADN polimeraza sintetizează catena complementară în prezență de deoxinucleotide și dideoxinucleotide (ddNTP), plecând de la extremitatea 3'-OH a primerului oligonucleotidic desemnat pe bază de complementaritate cu fragmentul pe care dorim să-l secvențializăm. Fiecare dideoxinucleotid este marcat cu un colorant fluorescent diferit. La fiecare încorporare

a unui ddNTP elongarea catenei este stopată, ceea ce va genera o colecție de fragmente de mărimi diferite, dar care se termină cu același ddNTP (Figura 72).

Dacă se păstrează o proporție corectă între prezența cele patru tipuri de dNTP și ddNTP, se va obține o colecție de fragmente nou sintetizate de lungimi diferite, terminate printr-un ddNTP diferit, corespunzător nucleotidului complementar de pe catena matriță. Fluorescența acestora va fi detectată de un cititor automat, iar semnalul va fi prelucrat obținându-se în final electroforegrama corespunzătoare secvenței analizate.

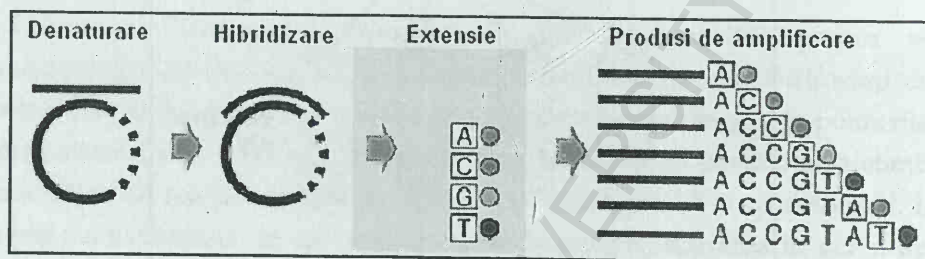


Figura 72. Principiul variantei Dye-terminator.

V.3 Secvențializarea de nouă generație

La ora actuală, secvențializarea prin metoda Sanger, prima generație de secvențializare, este treptat înlocuită de tehnici de secvențializare de nouă generație (*Next Generation Sequencing* - NGS). Acestea au avantajul de a realiza mai multe reacții de secvențializare în același timp, generând o cantitate imensă de informație, și necesită analiza integrată a datelor obținute.

Primele tehnologii de nouă generație au fost disponibile în anul 2007 (*Illumina Genome Analyzer*), iar la numai un an distanță a fost finalizată cu succes prima secvențializare a unui genom uman complet. La ora actuală, tehnologia NGS evoluează foarte rapid, crescând progresiv capacitatea de analiză și prelucrare a datelor și reducând semnificativ și continuu costurile.

Tehnicile de NGS utilizează în general secvențializarea prin sinteză pentru a genera și a analiza multiple fragmente de ADN în același timp. Această abordare conduce la obținerea unei cantități uriașe de date care trebuie apoi prelucrate. Secvențializarea prin sinteză prezintă două abordări: una de „singură moleculă”, alta de „ansamblu molecular” (mai multe ținte ADN amplificate și fixate apoi pe un suport solid). În cazul ambelor abordări, secvențializarea și detecția noilor baze

încorporate se poate desfășura în timp real (ADN polimeraza realizează sinteza fără întrerupere) sau într-o manieră de tip sincronizat controlată (ADN polimeraza sintetizează într-un mod „stop and go” noile catene datorită livrării controlate a nucleotidelor sau blocării temporare a extensiei prin furnizare de nucleotide modificate ori de catalizatori). Detecția nucleotidelor se realizează utilizând marcatori fluorescenți, compuși chemiluminescenți sau modificări de pH rezultate în urma încorporării noilor nucleotide la catenele nascente. În contrast cu secvențializarea prin metoda Sanger care poate genera fragmente de până la 1400 de nucleotide lungime, tehnicile NGS generează fragmente scurte cuprinse între 100 și 500 de nucleotide, dar într-un număr substanțial crescut (Figura 73).

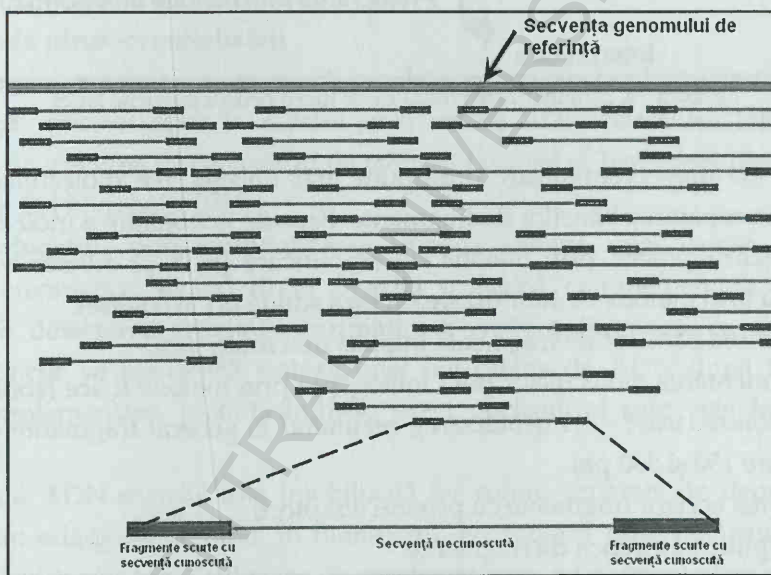


Figura 73. Asamblarea secvențelor de lungimi mici pentru a obține secvențe genomice în NGS.

În funcție de anul apariției și de chimia reacțiilor de sinteză, tehnicile NGS sunt împărțite în a doua, respectiv a treia generație de secvențializare. În ciuda variatelor abordări privind modul în care are loc reacția de sinteză a noilor catene, atât tehnicile de a doua, cât și cele de a treia generație, necesită etape extrem de complexe (Figura 74) de presecvențializare (prepararea probelor) și de postsecvențializare (analiza datelor).

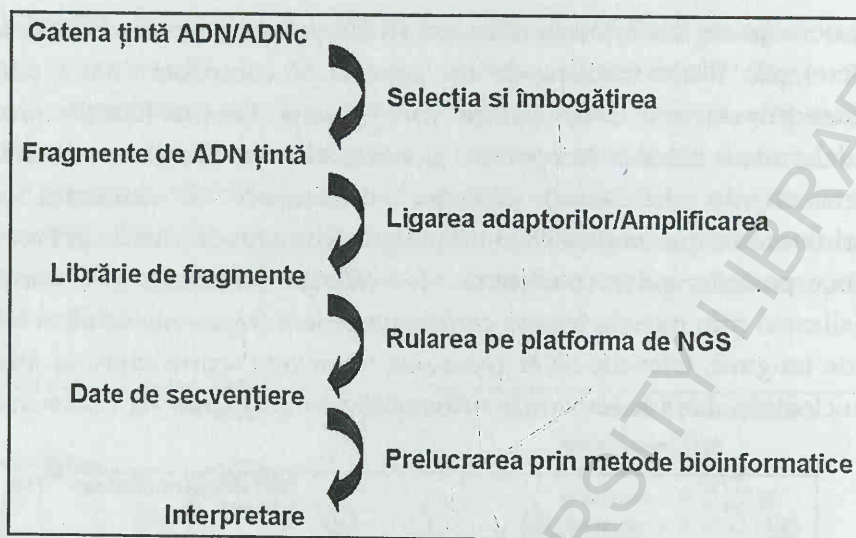


Figura 74. Schematizarea fluxului de lucru pentru tehnicile NGS.

Etapa de presecvențializare presupune atât îmbogățirea moleculelor țintă de ADN, cât și prepararea băncilor de fragmente. Faza de îmbogățire a moleculelor țintă se poate realiza practic prin metode de amplificare (PCR și diverse variante ale tehnicii) sau prin metode de hibridizare (în fază solidă ori în soluție).

Prepararea băncilor de fragmente implică mai mulți pași:

- i. fragmentarea moleculelor țintă îmbogățite prin metode fizice (sonicare, unde acustice – *acoustic wave* - ori nebulizare), rezultând în general fragmente cu lungimi cuprinse între 150 și 500 pb;
- ii. ligarea acestor fragmente cu primeri adaptor;
- iii. amplificarea băncii de fragmente.

V.3.1 A doua generație de secvențializare

Aceasta a fost reprezentată de mai multe platforme puse pe piață de diferiți producători (Tabel 3): pirosecvențializarea (Roche), secvențializarea prin terminator reversibil (Illumina), secvențializarea prin ligare (Applied Biosystems), secvențializarea de singură moleculă (Helicos).

Tabel 3. Comparație între tehnicile de secvențializare din prima, respectiv a doua generație.

Metoda	Piro secvențializarea (Roche)	Secvențializarea prin sinteză (Illumina)	Secvențializarea prin ligare (Applied Biosystems)	Sanger (variant dye-terminator) Applied Biosystems)
Lungimea fragmentului	700 pb	50-300 pb	50+35 sau 50+50 pb	Până la 1400 pb
Acuratețe	99,9%	98%	99,9%	99,9%
Citiri per rulare	1 milion	Până la 3 miliarde	1,4 miliarde	1
Timp de rulare	24 ore	Între una și 10 zile	Una până la 2 săptămâni	2 până la 3 ore

Metoda pirosecvențializării

Principiul metodei se bazează pe detecția pirofosfatului eliberat odată cu încorporarea nucleotidelor la nivelul unei catene ADN nascente. Tehnica a fost concepută de o echipă de cercetători de la *Royal Institute of Technology* din Stockholm, condusă de Pal Nyren, în 1996.

În principiu, pirosecvențializarea implică sinteza unei catene ADN prin procedee enzimatice, având drept matriță o catenă complementară. Metoda se bazează pe detectarea activității enzimatice a ADN polimerazei cu ajutorul altor enzime. Practic se realizează sinteza unei noi catene de ADN după tiparul unei catene complementare, identificându-se exact nucleotidul care este încorporat în fiecare pas.

Catena ADN matriță este imobilizată iar soluții separate de deoxinucleotide diferite sunt adăugate pe rând. În momentul încorporării unui nucleotid la nivelul catenei nascente are loc o eliberare de pirofosfat care, cu ajutorul altor enzime, este transformat rezultând în final chemiluminescență. Deci semnalul chemiluminescent este produs doar atunci când este legat pe bază de complementaritate un nou nucleotid la nivelul catenei nou sintetizate.

Inițial, ADN monocatenar matriță este imobilizat pe un suport solid. La acesta se adaugă un amestec enzimatic complex care conține ADN polimerază, ATP sulfurilază, luciferază și apirază. Pe lângă acestea se mai adaugă luciferine (molecule chemiluminescente care reprezintă substratul luciferazelor), adenozin-5'-fosfosulfat (APS) și primeri.

În a doua etapă se adaugă una dintre cele patru soluții de deoxinucleotid-trifosfați. În cazul soluției de dATP, acesta este modificat chimic (dATPaS), pentru a nu reprezenta un substrat activ pentru luciferază. În momentul în care ADN

polimeraza va încorpora unul sau mai multe nucleotide identice pe bază de complementaritate la nivelul catenei va avea loc o eliberare stoichiometrică (într-un raport cantitativ direct proporțional) de pirofosfat. ATP sulfurilaza va converti cantitativ pirofosfatul în ATP, în prezența adenozin-5'-fosfosulfatului. În prezența ATP, luciferaza catalizează transformarea luciferinei în oxiluciferină, ceea ce conduce la emisia unei cantități de lumină direct proporțională cu numărul de molecule de ATP consumate în vederea realizării catalizei. Reacția clasică catalizată de luciferaze este de transformare a luciferinelor în prezența oxigenului și a ATP, în oxiluciferine și lumină. Lumina astfel produsă este detectată de o cameră CCD (Charge Coupled Device) și analizată. În urma analizei se deduce secvența nucleotidelor care au fost încorporate la nivelul catenei nou sintetizate (Figura 75).

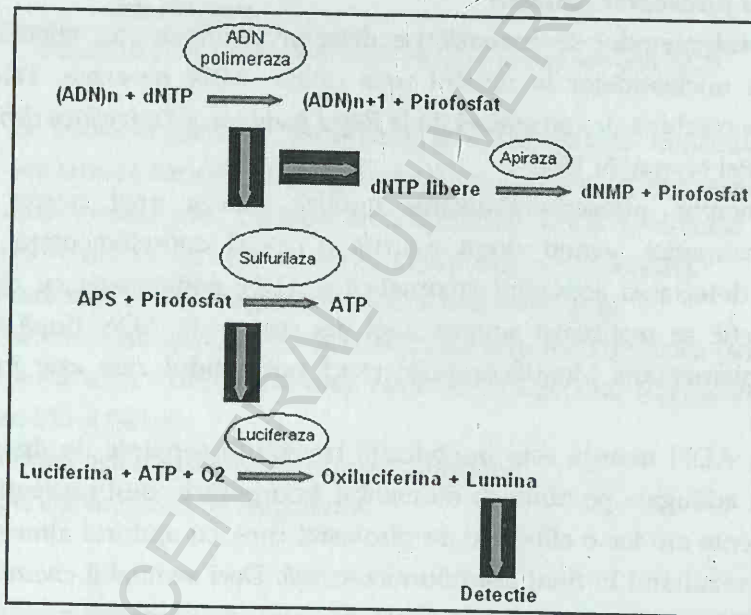


Figura 75. Principiul metodei de pirosecvențializare.

În cazul în care nucleotidele care au fost adăugate în reacție nu au fost încorporate, vor fi degradate de apirază pentru ca în reacție să poată fi reintroduse altele. Apiraza este o enzimă activată de ioni de calciu care catalizează hidroliza ATP la AMP și grupări fosfat. Chiar dacă substratul ei preferat este ATP, ea poate acționa și asupra altor nucleozid-trifosfați sau difosfați.

Limitele metodei sunt legate de lungimea fragmentelor (circa 500 nucleotide) care pot fi secvențializate. De asemenea, legarea matritelor ADN la substratul solid se realizează cu dificultate. Acestea pot fi preparate fie prin legare direct în fază solidă

(folosind bile magnetice acoperite cu streptavidină), fie utilizând procedee enzimatice. Începând cu anul 2007, metoda a fost complet automatizată.

Metoda secvențializării prin sinteză

Această metodă a fost pusă la punct în 2004 de către un grup de cercetători de la compania Solexa, acum parte a companiei Illumina. În cadrul acestei metode, primerii și moleculele țintă de ADN sunt inițial atașate la un suport, apoi amplificate cu ajutorul ADN polimerazelor formându-se colonii locale de ADN care apoi vor deveni clustere ADN. Pentru a determina secvența fragmentelor nou sintetizate se adaugă în reacția de sinteză patru tipuri de baze terminatoare reversibile de sinteză (*Reversible Terminator Bases*) în timp ce nucleotidele neîncorporate sunt eliminate. Bazele terminatoare reversibile de sinteză prezintă la capătul 3' terminal un blocator care împiedică alungirea catenei nascente și un marcator fluorescent. O cameră CCD preia semnalul fluorescent, apoi marcatorul împreună cu blocatorul sunt îndepărtați printr-un procedeu chimic, aceasta permițând intrarea într-un nou ciclu de sinteză.

Spre deosebire de pirosecvențializare, extinderea noii catene se face cu câte un singur nucleotid o dată, aceasta permițând achiziția de imagini de la o multitudine de colonii locale de ADN utilizând o singură cameră. Decuplarea reacției de sinteză de etapa de preluare a imaginilor permite o optimizare a fluxului de lucru și teoretic, o capacitate nelimitată de secvențializare. Singura limitare tehnică a metodei este legată de numărul de camere amplasate la nivelul platformei de secvențializare și de performanțele tehnice ale acestora (Metzker, 2010). Astfel, în 2012, platformele care utilizează această tehnologie au atins capacitatea de a realiza resecvențializarea unui genom uman pe zi, pentru un singur instrument, echipat cu o singură cameră.

Metoda de secvențializare prin ligare (SOLiD - *Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection*)

Tehnologia a fost patentată de Applied Biosystems și a fost disponibilă pe piață din 2008. Etapele generale ale tehnicii sunt următoarele (Metzker, 2010):

- i. Fragmentarea aleatoare a ADN genomic.
- ii. Imobilizarea câte unui singur fragment de ADN pe un suport solid.
- iii. Amplificarea fragmentelor de ADN la nivelul suportului solid cu formarea coloniilor de amplificare.
- iv. Secvențializarea și verificarea ulterioară, *in situ*, a produșilor utilizând scanarea fluorescentă sau chemiluminescentă.

Astfel, în prima etapă are loc fragmentarea ADN genomic în mici fragmente la nivelul cărora se vor adăuga două tipuri diferite de adaptor (ex. A1 și A2). Banca de fragmente rezultată va conține fragmente scurte de ADN marcate cu câte un adaptor la fiecare capăt (A1-fragment-A2). Imediat după aceasta se trece la realizarea unei reacții PCR în emulsie (emulsia este reprezentată de picături de apă suspendate în ulei). Reacția de amplificare se desfășoară folosind fragmentele de ADN din banca rezultată anterior, doi primeri (P1 și P2) complementari cu cei doi adaptori fixați la secvențele scurte, celelalte componente ale reacției PCR și perle solide cuplate cu unul dintre primeri (ex. P1). Este recomandată realizarea unei diluții a băncii de ADN pentru a crește probabilitatea apariției picăturilor care să conțină în interior un singur fragment de ADN și o singură perlă solidă. În fiecare astfel de picătură, matrița ADN hibridizează cu primerul atașat la suport prin regiunea complementară. Apoi, ADN polimeraza va putea realiza extensia secvenței complementare pornind de la primerul respectiv, ceea ce va conduce la formarea unei perle solide îmbogățită în ampliconi ai unei singure matrițe (Metzker, 2010). După terminarea reacției de amplificare, matrițele sunt denaturate și disociate de la nivelul suporturilor solide.

În practică, s-a constatat că numai 30% dintre perlele solide au legate produși de amplificare. Pentru a crește numărul acestora, la soluție se adaugă alte perle mai mari, confecționate din polistiren, căptușite cu adaptorul A2. În acest fel, orice perlă solidă care are atașat produsul de amplificare va lega perlele de polistiren prin intermediul capătului corespunzător primerului P2 al produsului de amplificare. Complexul format va putea fi separat ușor de perlele solide care nu au atașat produși de amplificare. După separarea perlelor legate de ampliconi (procentul acestora va crește în urma tratamentului de la 30 la 80%), sub influența temperaturii se va realiza disocierea față de bilele de polistiren (Metzker, 2010).

Capătul 3' al ampliconului (capătul corespunzător primerului P2) va fi modificat chimic. În următorul pas, modificarea va permite legarea covalentă a acestuia, într-o manieră aleatoare, la o suprafață de sticlă. Practic, la un moment dat, perlele vor fi dispuse întâmplător la suprafața sticlei, atașate prin legături covalente care au fost stabilite la nivelul extremităților 3' terminale ale ampliconilor.

În continuare se va desfășura reacția de secvențializare prin ligare. Procesul de ligare se desfășoară folosind o sondă octamer specifică. Sonda are o lungime de 8 nucleotide și prezintă o grupare hidroxil la capătul 3' terminal și un marcator fluorescent la capătul 5'. De asemenea, la nivelul acestei există un situs de clivare dispus între al cincelea, respectiv al șaselea nucleotid din structură. Primele două baze de la capătul 3' sunt complementare cu fragmentele care trebuie secvențializate.

Nucleotidele din pozițiile 3, 4 și 5 sunt degenerare astfel încât să poată hibridiza cu orice nucleotid din secvența țintă. Nucleotidele 6-8 sunt de asemenea degenerare, dar pot fi clivate împreună cu marcatorul fluorescent pe măsură ce reacția înaintază. Clivarea acestora lasă un capăt 5' fosfat liber pentru realizarea altor reacții de ligare. În acest mod pozițiile $n+1$, $n+2$, respectiv $n+6$, $n+7$ sunt corect împerecheate, iar nucleotidele corespunzătoare $n+3$, $n+4$ și $n+5$ rămân a fi determinate în runde următoare ale reacției de secvențializare (Metzker, 2010).

Fiecare pas al secvențializării este practic compus din cinci runde care constau în aproximativ 5-7 cicluri. Fiecare rundă debutează cu adăugarea unui primer special complementar cu P1. Acesta considerăm care are n nucleotide lungime, iar extremitatea lui 5' este complementară cu extremitatea 3' a P1. Ulterior, în fiecare ciclu, sonda octamer este adăugată și ligată în concordanță cu primul și al doilea nucleotid din structură. Sondele nehibridizate sunt îndepărtate prin spălare, iar semnalul fluorescent al sondelor legate este captat și măsurat. Ulterior, sonda atașată este clivată între nucleotidele 5 și 6 iar reacția poate intra într-o nouă rundă. O reacție completă de 5 runde permite secvențializarea aproximativ a 25 de nucleotide din matriță pornind de la P1 (Metzker, 2010).

Pentru decodificarea semnalelor luminoase trebuie ținut cont de faptul că fiecare culoare corespunde unei succesiuni de două nucleotide. Pentru determinarea secvenței trebuie să cunoaștem deci una dintre aceste nucleotide (acesta este de fapt nucleotidul încorporat în ultimul ciclu al ultimei runde).

V.3.2 A treia generație de secvențializare

Secvențializarea pe baza detecției variațiilor de pH (*Ion Semiconductor Sequencing*)

Este o metodă de secvențializare prin sinteză, în timpul căreia catena complementară este sintetizată pe baza tiparului oferit de catena matriță. Aparatele care realizează aceasta tehnică au fost patentate și sunt comercializate de compania Life Technologies. Metoda se bazează pe detecția ionilor de hidrogen care sunt eliberați în timpul adăugării noilor nucleotide la catena nou sintetizată. *In vivo*, incorporarea unui deoxinucleotid la un lanț polinucleotidic în creștere este soldată cu eliberarea pirofosfatului și a unui ion de hidrogen. Totodată, numai deoxinucleotidele complementare matriței pot fi încorporate la nivelul lanțului aflat în creștere.

Reacția de sinteză se realizează la nivelul unui microcip semiconductor prevăzut cu microgodeuri. Acestea conțin copii monocatenare ale ADN care urmează a fi secvențializate și toate componentele necesare reacției de sinteză. Microgodeurile sunt inundate repetat cu câte unul dintre cele patru dideoxinucleotide, iar în momentul în care există complementaritate, are loc formarea legăturii fosfodiesterice și, concomitent, eliberarea ionilor de hidrogen. Această infimă eliberare de ioni de hidrogen modifică valoarea de pH a soluției, modificarea fiind detectată de un pH-metru special (Figura 76).

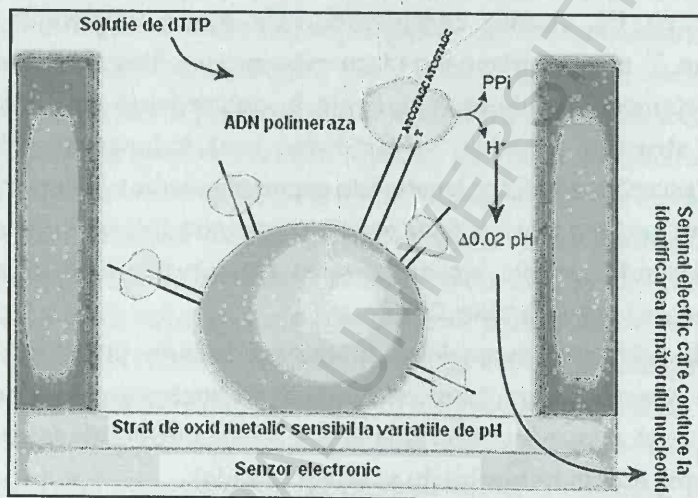


Figura 76. Secvențializarea prin detecția variațiilor de pH.

pH-metrul este reprezentat de fapt de un strat senzitiv dispus sub microgodeuri, acoperind toată suprafața microcipului. Acest strat răspunde la toate modificările de pH de la nivelul microgodeurilor și le transmite către computer sub forma unor semnale care sunt prelucrate și transformate în secvență nucleotidică. Lungimea unei secvențe este de aproximativ 400 de nucleotide, iar pentru un singur microcip se poate ajunge la un total de 100 Mb pentru fiecare rulare.

Limitările metodei se referă la timpul lung alocat rulării (sinteza are loc în timp real) datorită introducerii treptate a nucleotidelor, dar și problemelor care apar la nivelul regiunilor repetitive. Astfel, dacă la nivelul secvenței matriță există regiuni în care se repetă un singur nucleotid într-un număr mai mare de 5 repetiții (ex. AAAAA), aceasta va conduce la încorporarea numărului corespunzător de nucleotide complementare și la eliberarea stoechiometrică de ioni de hidrogen. Problema apare în diferențierea modificărilor de pH produse de eliberarea spre

exemplu a 7 sau 8 ioni de hidrogen simultan. Din acest motiv, secvențializarea acestor regiuni se face cu o mare rată de eroare. O altă limitare apare datorită lungimii relativ scăzute a secvențelor generate, ceea ce face dificilă asamblarea acestora pentru obținerea secvenței finale.

Secvențializarea prin nanosfere de ADN (*DNA nanoball sequencing*)

Metoda utilizează replicarea după modelul cercului rotativ pentru a genera nanosfere de acid nucleic pornind de la mici fragmente de ADN genomic. Ulterior, sonde fluorescente vor lega secvențele ADN complementare, iar acestea vor fi apoi atașate prin reacții de ligare la regiuni ancoră legate la rândul lor de regiuni cu secvență cunoscută din matrița ADN. Secvența nucleotidică va fi determinată pe baza fluorescenței sondelor (Metzker, 2010). Metoda este pusă în practică și comercializată de compania Complete Genomics.

Metoda necesită inițial generarea unor fragmente scurte de ADN, într-o formă circulară. Pentru a realiza astfel de fragmente, ADN genomic este mai întâi fragmentat în secvențe de aproximativ 400-500 pb, ligat cu adaptor nucleotidici și mai apoi circularizat. Fragmentele circulare sunt replicate într-o etapă ulterioară prin modelul cercului rotativ (modelul de replicare al fagului M13) rezultând un număr foarte mare de copii monocatenare. Acestea sunt apoi concatenate cap-coadă și compactate în mai multe nanosfere care, la rândul lor, sunt adsorbite la nivelul celulelor de secvențializare.

Inițial, pentru a realiza etapa de fragmentare, moleculele de ADN sunt supuse unei ultrasonificări în vederea ruperii dublelor catene într-o manieră aleatoare. Etapa este foarte importantă deoarece obținerea unui interval de mărime relativ redus pentru fragmentele de ADN va permite o prelucrare finală a datelor mult mai eficientă. Tocmai de aceea, selectarea acelor fragmente aflate în intervalul optim de mărime se face prin electroforeză în gel de poliacrilamidă, ulterior acestea fiind izolate și purificate de la nivelul gelului.

În următoarea etapă, se trece la atașarea unor secvențe ADN adaptor la fragmentele obținute în prima etapă, astfel încât regiunile cu secvență necunoscută să fie flancate de regiuni a căror secvență o cunoaștem. În prima rundă a ligării, un prim adaptor (AD1) este atașat la ambele extremități ale fragmentelor trecându-se apoi la amplificare prin PCR. Secvența adaptorului este aleasă astfel încât să permită circularizarea după amplificare. Secvența circulară este apoi clivată cu o endonuclează de restricție pentru formarea unui ADN dublu catenar liniar la nivelul căruia se adaugă un al doilea adaptor (AD2). Urmează o nouă reacție de amplificare

prin PCR, o nouă recircularizare a ampliconilor și o nouă clivare cu enzime de restricție. Ciclurile de ligare a adaptorilor, amplificare, circularizare, clivare se repetă de încă două ori (cu adaptorii AD3 și AD4), în final rezultând o moleculă circulară de ADN conținând și matrița noastră (Metzker, 2010).

Moleculele circulare obținute sunt amplificate după modelul cercului rotativ cu ajutorul Phi29 ADN polimerazei. Noile monocatene sintetizate astfel sunt eliberate de la nivelul matriței circulare. Cei patru adaptorii, conținând secvențe palindromice, cauzează o autorepliere a monocatenei rezultând o nanosferă de ADN cu diametrul de circa 300 nm.

În continuare, nanosferele de ADN sunt atașate la celule de secvențiere speciale, căptușite cu dioxid de siliciu, titan, hexametil-disilazan (HMDS) și un material fotorezistent. Apoi, la celulele de secvențializare sunt adăugate molecule ancoră oligonucleotidice, complementare cu unul dintre adaptorii prezenți la nivelul nanosferelor ADN (drept sau stâng). În pasul următor, T4 ADN ligaza și o soluție conținând un amestec de 4 tipuri de decameri nucleotidici formați din nucleotide degenerate cu excepția unei singure poziții sunt adăugate peste celulele de secvențializare. Fiecare sondă decamerică va conține câte o poziție interogativă de secvență, nucleotidul corespunzător acesteia fiind marcat fluorescent. Numai sondele având poziția interogativă de secvență complementară se vor lega la matriță. T4 ADN ligaza va lega sonda la ancoră și astfel fluorescența va putea fi detectată. Sondele care nu sunt perfect complementare nu se vor atașa de matriță și vor putea fi spălate.

După detecția semnalului fluorescent, sondele sunt îndepărtate de la nivelul nanosferelor și un nou ciclu de reacție se va repeta, aceasta până când toate cele 10 poziții interogative de secvență de lângă ancoră vor fi acoperite. Ulterior, se va adăuga o nouă ancoră, alți decameri nucleotidici și ciclurile de reacție se repetă. Ordinea nucleotidelor din secvență este determinată pe baza fluorescenței sondelor detectată cu ajutorul unei camere CCD.

În general, o mare parte din fragmentele inițiale, având 400-500 pb lungime, este înlocuită de adaptorii. Astfel, de obicei, secvențele obținute pentru fiecare fragment, cuprind aproximativ 35 de nucleotide de la capetele acestuia. Partea de mijloc a fragmentului (având circa 330-430 pb lungime) rămâne necunoscută. Tocmai de aceea, asamblarea bioinformatică a acestor secvențe scurte de câte 35 de nucleotide este foarte dificil de realizat, acesta reprezentând unul dintre dezavantajele metodei.

Secvențializarea în timp real (*Single Molecule Real Time Sequencing*)

Tehnica de secvențializare în timp real, cunoscută și sub numele de *SMRT sequencing*, este pusă pe piață de compania Pacific Biosciences și se bazează pe detecția directă a încorporării nucleotidelor marcate fluorescent la nivelul catenei nascente cu ajutorul unui modul optic special numit *Zero-Mode Waveguide* (ZMW). Secvențializarea propriu-zisă se desfășoară la nivelul unui microcip care conține multiple module optice ZMW. În interiorul fiecărui modul optic se găsește o singură ADN polimerază activă și o singură moleculă monocatenară de ADN care servește drept matriță, immobilizată într-o zonă în care semnalele luminoase sunt vizibile. Datorită acestui fapt, la acest nivel se formează o „cameră de vizualizare”, permițându-se astfel monitorizarea activității ADN polimerazei la nivel molecular.

Fiecare dintre cele patru nucleotide sunt marcate cu fluorocromi care permit detecția reacției de încorporare a acestora la nivelul catenei nou sintetizate. În acest mod, reacția de sinteză este monitorizată în timp real. Numai acele nucleotide care vor fi încorporate vor pătrunde la nivelul „camerelor de vizualizare” și, ca urmare, doar fluorescența acestora va putea fi detectată. Colorantul fluorescent este atașat la nivelul grupărilor fosfat ale deoxinucleotidelor astfel încât, în momentul încorporării unui nou nucleotid, fluorocromul este clivat împreună cu grupările fosfat din pozițiile β , respectiv γ , și este eliberat în mediul de reacție. Odată detașat de la nivelul nucleotidului, fluorocromul difuzează în afara „camerei de vizualizare”, fluorescența acestuia devenind necuantificabilă.

Cantitatea de date furnizată de această tehnică depinde mult de lungimea moleculelor de ADN supuse secvențializării, dar și de numărul de module optice ZMW ce poate fi plasat la nivelul unui microcip. Aplicațiile metodei cuprind secvențializarea *de novo*, resecvențializarea, detecția metilărilor, dar și a diferitelor tipuri de mutații.

CAPITOLUL VI

UTILIZAREA ÎN PRACTICĂ A TEHNICILOR DE BIOLOGIE MOLECULARĂ

VI.1 Testarea paternității și identificarea individuală

Progresele realizate în genetica mamiferelor în ultimii ani, nu au ocolit animalele de fermă. Recent, crescătorii de animale au apelat la tehnicile de biologie moleculară și la folosirea markerilor ADN pentru verificarea descendenței și pentru stabilirea identității și paternității animalelor. În acest caz este folosită tehnica PCR pentru detectarea secvențelor repetitive scurte din genom, respectiv a microsateliților. Secvențele repetitive conțin multe subtipuri diferite care au fost clasificate în minisateliți, microsateliți, α -sateliți, LINE, SINE și secvențe telomerice. Aceste secvențe repetitive sunt de o mare importanță pentru studiile genetice privind identificarea individuală, analizele de paternitate, cartarea genetică și studiul evoluției speciilor și raselor.

Microsateliții sunt unii dintre cei mai importanți markeri moleculari folosiți în studiul genoamelor. Aceștia sunt reprezentați de secvențe repetitive în tandem care, în general, nu sunt transcrise, și care sunt prezente la nivelul tuturor cromozomilor eucariotelor. Sunt secvențe scurte având unități repetitive cu lungimi de 2 până la 9 pb, dispersate în întregul genom. Microsateliții prezintă un polimorfism foarte crescut, aceasta datorându-se faptului că fiecare individ prezintă un număr diferit de repetiții pentru un anumit locus. Ei pot fi amplificați rapid pornind de la cantități foarte mici de ADN folosind tehnica PCR. Mărimea fragmentelor amplificate poate fi identificată folosind un analizator genetic automat care folosește sistemul de separare prin electroforeză capilară și de detecția în fluorescență a produșilor analizați. Una dintre cele mai importante aplicații ale tehnicii PCR multiplex este testarea paternității utilizând seturi de microsateliți.

Polimorfismul microsateliților reflectă moștenirea genetică și permite detectarea diferențelor între diferiți indivizi. Prin urmare, aceștia sunt extrem de utili pentru stabilirea identității și verificarea paternității, iar testele ADN sunt mult mai precise și sunt pretabile pentru automatizare și procesarea rapidă a datelor, crescând mult eficiența analizelor. Pentru verificarea paternității, seturile de microsateliți trebuie să

prezintă un grad înalt de polimorfism, un nivel mutațional scăzut, să fie ușor de marcat și să poată fi amplificate prin PCR multiplex.

Pentru ca un microsatelit să fie selectat în vederea utilizării pentru testele de identificare individuală și de testare a paternității trebuie să prezinte niște caracteristici care să-l recomande pentru aceasta. Astfel, există mai mulți parametri care ne pot indica dacă microsateliții se pretează sau nu pentru astfel de analize.

Probabilitatea de potrivire (pM - *Matching Probability*) este un indice care se referă la numărul de indivizi din populația studiată care au fost analizați anterior pentru a identifica același profil ADN. Cu cât valoarea obținută este mai mică, cu atât microsatelitul respectiv este mai valoros în realizarea testelor de paternitate. Pentru calcularea valorii pM pentru un locus se folosește următoarea formulă:

$$pM = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n P_{ij}^2$$

unde i și j reprezintă frecvențele tuturor alelelor din populație, iar P_{ij} frecvența tuturor genotipurilor posibile.

În cazul mai multor loci, pM se calculează prin realizarea produsului între valorile individuale ale fiecărui locus în parte.

Puterea de discriminare (Pd - *Power of Discrimination*) reprezintă capacitatea de discriminare între indivizii unei populații studiate. O valoare mare este normală, pe când o valoare mică indică un nivel scăzut de polimorfism al microsatelitului respectiv. Pentru calcularea valorii Pd la nivelul unui singur locus se folosește formula:

$$Pd = 1 - pM$$

iar pentru mai mulți loci:

$$Pd_{combined} = 1 - \prod_{i=1}^n (1 - Pd_i)$$

unde i reprezintă numărul de loci.

Puterea de excludere (PE - *Power of Exclusion*) reprezintă procentul de indivizi din cadrul unei populații care pot avea un alt profil ADN decât cel care tocmai a fost analizat. Valoarea PE pentru un singur locus se calculează utilizând formula:

$$PE = h^2(1 - 2hH^2)$$

unde h este frecvența indivizilor heterozigoți la nivelul aceluși locus, din cadrul populației analizate, iar H frecvența indivizilor homozigoți.

Pentru mai mulți loci, valoarea PE se calculează folosind ecuația:

$$PE_{\text{typical}} = 1 - \prod_{i=1}^n (1 - PE_i)$$

În continuare prezentăm un exemplu de testare a paternității la cabaline utilizând un set de 17 markeri microsateliți. Datele privind cartarea genomului (Shiue et al., 1999) au indicat faptul că toți aceștia se află pe cromozomi diferiți și tocmai de aceea există o probabilitate foarte mare să segreghe total independent, aceasta conducând la creșterea probabilității de excludere obținute.

Pentru amplificare se realizează o reacție PCR multiplex care utilizează o combinație de mai mulți primeri cu secvențe specifice fragmentelor de interes. Rezultatul va fi amplificarea concomitentă a acestor zone. Pentru a putea funcționa, metoda trebuie să utilizeze pentru amplificare primeri cu temperaturi de hibridizare similare la secvențele ADN de interes.

La cabaline, amplificarea microsateliților se poate realiza cu ajutorul kitului *StockMarks For Horses* (Applied Biosystem). Acesta conține 17 perechi de primeri necesari amplificării a 17 microsateliți, marcați cu patru coloranți fluorescenți diferiți (6-FAM, NED, VIC și PET). Microsateliții sunt amplificați printr-o singură reacție PCR multiplex. După amplificare, pentru a putea fi vizualizate, fragmentele obținute sunt supuse unei electroforeze capilare cu detecție în fluorescență. Concomitent cu migrarea acestora, este încărcat și un standard de masă moleculară, marcat la rândul său cu un fluorocrom diferit (LIZ), acesta permițând estimarea cu o înaltă precizie a mărimii fragmentelor amplificate. Marcarea microsateliților și a standardului de masă moleculară cu cei cinci coloranți fluorescenți diferiți permite practic vizualizarea acestora în cadrul aceleiași migrări. Cei 17 microsateliți utilizați sunt prezentați în tabelul 4.

Tabel 4. 17 loci microsateliți specifici cabalinelor.

Locus	Marcator	Culoare	Mărimea estimată a fragmentelor (pb)
VHL20	6-FAM	Albastră	83-102
HTG4	6-FAM	Albastră	116-137
AHT4	6-FAM	Albastră	140-166

HMS7	6-FAM	Albastră	167-187
HTG6	VIC	Verde	74-103
AHT5	VIC	Verde	126-147
HMS6	VIC	Verde	154-170
ASB23	VIC	Verde	276-212
ASB2	VIC	Verde	237-268
HTG10	NED	Galbenă	83-110
HTG7	NED	Galbenă	114-128
HMS3	NED	Galbenă	146-170
HMS2	NED	Galbenă	215-236
ABS17	PET	Roșie	104-116
LEX3	PET	Roșie	137-160
HMS1	PET	Roșie	166-178
CA425	PET	Roșie	224-247

Rezultatele sunt prelucrate cu ajutorul programelor specializate, iar în urma analizei se va obține amprenta genetică pentru fiecare individ/exemplar.

Pentru a interpreta corect rezultatele unei analize de microsateliți trebuie să ținem cont de mai multe aspecte. Primerii din kitul StockMarks realizează amplificarea unor microsateliți care prezintă un număr variat de repetiții dinucleotidice. Acestea conferă un aspect caracteristic profilelor genetice obținute. De asemenea, trebuie menționat că numărul de alele prezente pe un anumit locus depinde de homo- sau heterozigoția individului analizat. Astfel, la indivizii homozigoți care prezintă o singură alelă pe un anumit locus, pe electroforegramă o să apară un singur semnal. Indivizii heterozigoți prezintă două alele diferite pe un anumit locus, deci pe electroforegramă vor apărea două semnale. Alura semnalelor obținute depinde și ea de mărimea microsateliților amplificați.

Pentru a realiza interpretarea corectă a testelor se identifică inițial alelele produșilor. Acestea trebuie să fie moștenite câte una de la fiecare genitor în parte. Dacă nu există nicio nepotrivire la nivelul tuturor locilor analizați putem afirma că produsul aparține cu o probabilitate de peste 99,999% aceluși cuplu de genitori. În figurile 77-80 și în tabelul 5 sunt prezentate comparativ rezultatele unui test de paternitate realizat cu un set de 17 microsateliți la o familie de cai din rasa Cal de Sport Românesc.

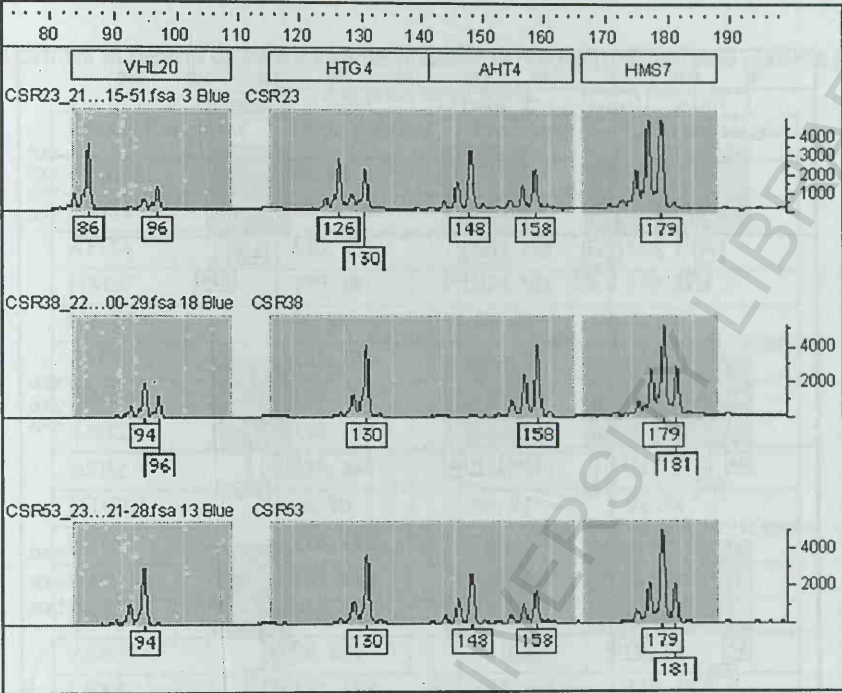


Figura 77. Profilele exemplarelor analizate pentru locii VHL20, HTG4, AHT4 și HMS7.

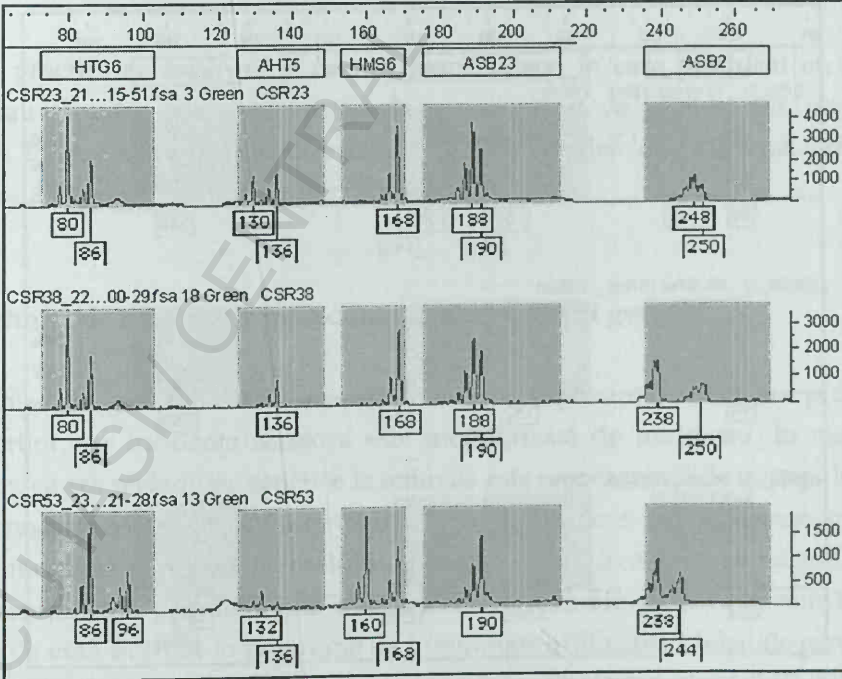


Figura 78. Profilele exemplarelor analizate pentru locii HTG6, AHT5, HMS6, ASB23 și ASB2.

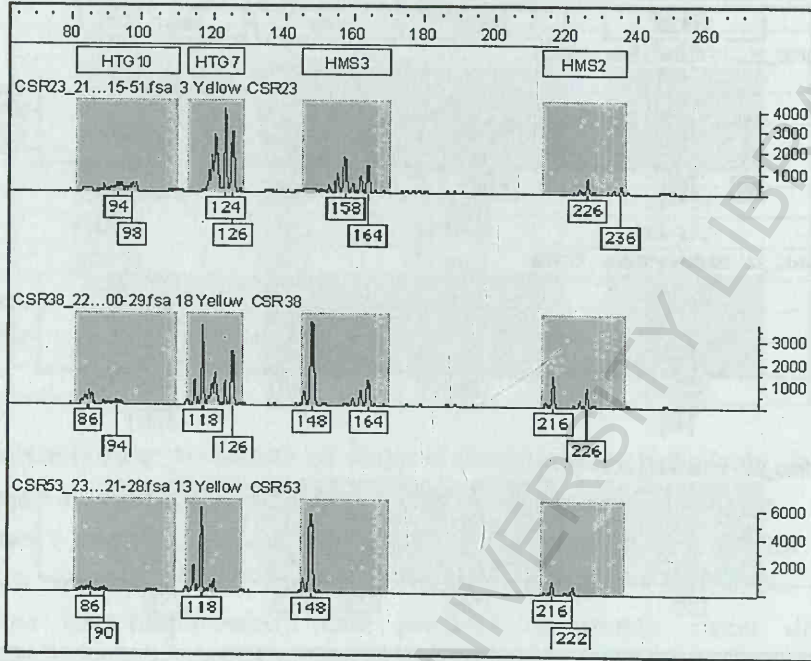


Figura 79. Profilele exemplarelor analizate pentru locii HTG10, HTG7, HMS3 și HMS2.

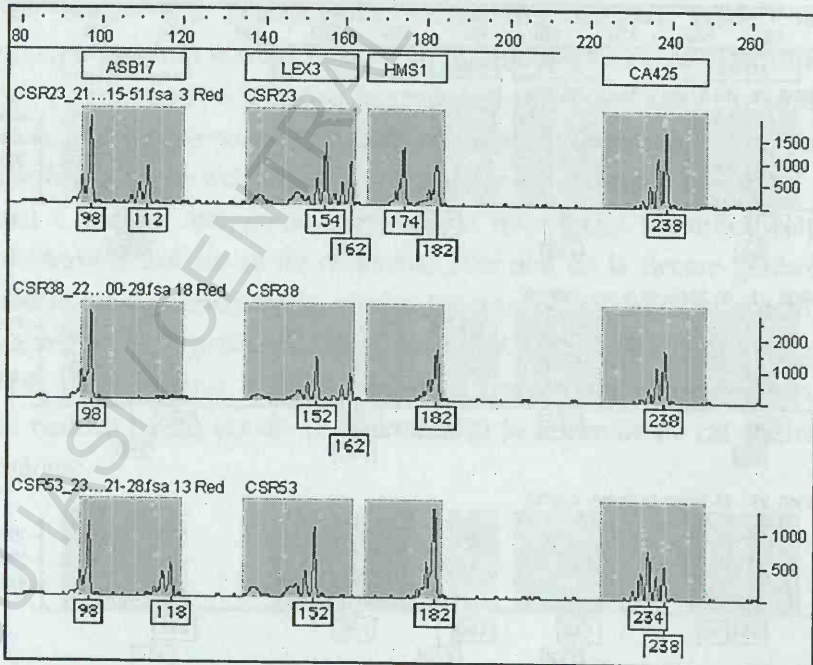


Figura 80. Profilele exemplarelor analizate pentru locii ASB17, LEX3, HMS1 și CA425.

Tabel 5. Mărimea în perechi de baze a alelelor prezente la produs (CSR38), linia maternă (CSR23) și linia paternă (CSR53).

Locus/ Exemplar	Linie paternă	Produs	Linie maternă
VHL20	94, 94	94, 96	86, 96
HTG4	130, 130	130, 130	126, 130
AHT4	148, 158	158, 158	148, 158
HMS7	179, 181	179, 181	179, 179
HTG6	86, 96	80, 86	80, 86
AHT5	132, 136	136, 136	130, 136
HMS6	160, 168	168, 168	168, 168
ASB23	190, 190	188, 190	188, 190
ASB2	238, 244	238, 250	248, 250
HTG10	86, 90	86, 94	94, 98
HTG7	118, 118	118, 126	124, 126
HMS3	148, 148	148, 164	158, 164
HMS2	216, 222	216, 226	226, 236
ASB17	98, 118	98, 98	98, 112
LEX3	152, 152	152, 162	154, 162
HMS1	182, 182	182, 182	174, 182
CA425	234, 238	238, 238	238, 238

În practică se întâlnesc și cazuri de excludere, în care produsul nu aparține unuia sau ambilor părinți. În astfel de cazuri el nu va avea alelele comune cu genitorii. Pentru a avea un caz de excludere, la analiza alelelor, trebuie să întâlnim cel puțin două nepotriviri între genitori și produs.

VI.2 Tehnici de diagnostic molecular al unor maladii genetice

Maladiile genetice care afectează animalele reprezintă principala problemă a crescătorilor, iar incidența acestora este monitorizată de mulți ani. În majoritatea cazurilor, cauza maladiilor genetice la animale este reprezentată de mutații la nivelul unor gene autozomale. Manifestarea unei mutații recesive implică prezența a două gene mutante în genotipul animalului afectat. Răspândirea acestor maladii poate fi atent monitorizată prin limitarea împerecherilor naturale și mărirea numărului de masculi de elită utilizați în programe de înseminare artificială. Maladiile genetice pot determina anomalii atât fizice cât și fiziologice, cu un impact negativ asupra

vitalității. În cazul animalelor, un important efect al unei maladii este scăderea sau pierderea unei calități productive. Una dintre principalele aplicații practice ale tehnicilor de biologie moleculară este diagnosticarea maladiilor genetice.

VI.2.1 Diagnosticarea maladiilor genetice prin analiza fragmentelor marcate fluorescent

SCID (*Severe Combined Immunodeficiency*) este o maladie autozomal recesivă întâlnită la mamiferele superioare, inclusiv la om. La cabaline, boala este cauzată de o deleție de cinci perechi de baze la nivelul genei care codifică subunitatea catalitică a protein kinazei ADN dependente (Shin et al., 1997) și a fost raportată numai la rasa Arabă din Australia și SUA.

Maladia se caracterizează printr-o diminuare severă a numărului de limfocite B și T și prin lipsa sintezei de anticorpi. Dacă colostrul nu este acceptat, viața exemplarelor cu SCID se scurtează drastic. Boala se manifestă numai în cazul homozigoților recesivi. În conformitate cu o statistică realizată de laboratoarele VetGen, în 2005, din 6095 de cai de rasă Arabă testați, 82,5% erau sănătoși, 17,2% erau purtători și 0,3% erau homozigoți recesivi (www.vetgen.com/scidstats.html).

Conform Shin et al. (1997), în cazul apariției deleției are loc o deplasare a cadrului de citire care va duce la activarea unui codon STOP (codonul TAA) și deci la sinteza unei proteine trunchiate care nu-și poate îndeplini funcția biologică.

În vederea diagnosticării maladii prin tehnica PCR au fost utilizați primeri sens marcați cu un colorant fluorescent (6-FAM). Producții de amplificare sunt supuși unei electroforeze capilare cu detecție în fluorescență, în prezența unui standard de masă moleculară marcat la rândul său cu un colorant fluorescent (Georgescu et al., 2006).

În funcție de mărimea fragmentelor de amplificare obținute se poate stabili cu certitudine dacă individul analizat este sănătos, purtător sau bolnav. Astfel, dacă se analizează un individ homozigot normal se va obține un singur semnal cu mărimea de 235 pb (Figura 81), dacă este vorba despre un individ purtător se vor identifica două semnale, unul la 235 pb și altul la 230 pb (datorită deleției de 5 pb), iar dacă individul analizat este homozigot recesiv se va evidenția un singur semnal la 230 pb. Semnalul unic obținut în cazul indivizilor homozigoți este datorat existenței a două alele identice ca mărime care se suprapun.

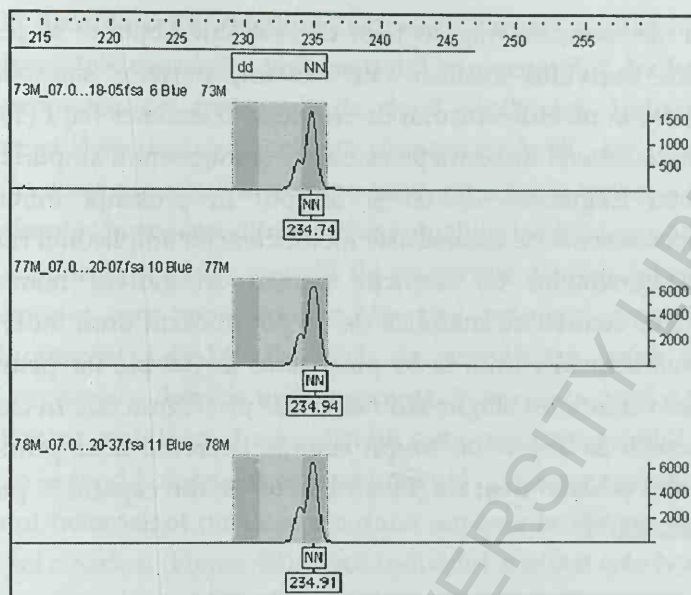


Figura 81. Profilele pentru trei exemplare din rasa Arabă diagnosticate normale pentru SCID.

O altă boală genetică este HYPP (*Hyperkalemic Periodic Paralysis*) care este o maladie autozomală descoperită la rasa de cai Quarter Horse, dar și la om. Cauza este o mutație punctiformă (C trece în G) la nivelul genei care codifică subunitatea α a canalului de sodiu din membrana celulelor musculare striate (Rudolph et al., 1992). În urma mutației are loc înlocuirea fenilalaninei cu leucină ceea ce conduce la sinteza unei proteine anormale care nu-și poate îndeplini funcția biologică, iar această modificare are ca rezultat creșterea excesivă a permeabilității membranei celulelor musculare pentru ioni de potasiu.

Manifestările bolii sunt creșterea frecvenței respiratorii, spasme musculare necontrolate, stare de slăbiciune generală. În cazurile cele mai grave poate surveni decesul. Efectele apar și la indivizii heterozigoți, dar sunt extrem de puternice la cei homozigoți recesivi (Rudolph et al., 1992). Secvențializarea genei omoloage de la om a evidențiat alte două mutații care duc la declanșarea bolii.

În vederea diagnosticării maladiei au fost combinate tehnica PCR-RFLP și identificarea fragmentelor marcate fluorescent în sistem automat. Primerul sens utilizat la amplificare este marcat cu un colorant fluorescent (6-FAM). Ampliconii obținuți sunt supuși ulterior unei reacții de digestie cu endonucleaza de restricție *Taq I*, iar produșii de restricție sunt analizați prin electroforeză capilară cu detecție în fluorescență în prezența unui standard de masă moleculară (Georgescu et al., 2007).

În funcție de mărimea fragmentelor de restricție obținute se poate stabili cu certitudine dacă individul analizat este sănătos, purtător sau bolnav. Mutația punctiformă apare la nivelul situsului de restricție al enzimei *Taq I* (T/CGA). Astfel, în absența mutației situsul de restricție este activ și fragmentul amplificat este tăiat de enzimă în două fragmente de 65 și 35 pb. În prezența mutației, secvența palindromică recunoscută de enzimă este modificată, iar ampliconul rămâne intact.

Analiza fragmentelor de restricție pentru un individ homozigot normal prezintă un singur semnal cu mărimea de 65 pb. În cazul unui individ purtător se evidențiază două semnale, unul la 65 pb și altul la 100 pb, iar pentru un individ homozigot recesiv apare un singur semnal la 100 pb (Figura 82). În cazul indivizilor homozigoți normali se obține un singur semnal deoarece doar primerul sens este marcat fluorescent și astfel doar fragmentul de 65 pb din capătul 5' poate fi detectat (Georgescu et al., 2007).

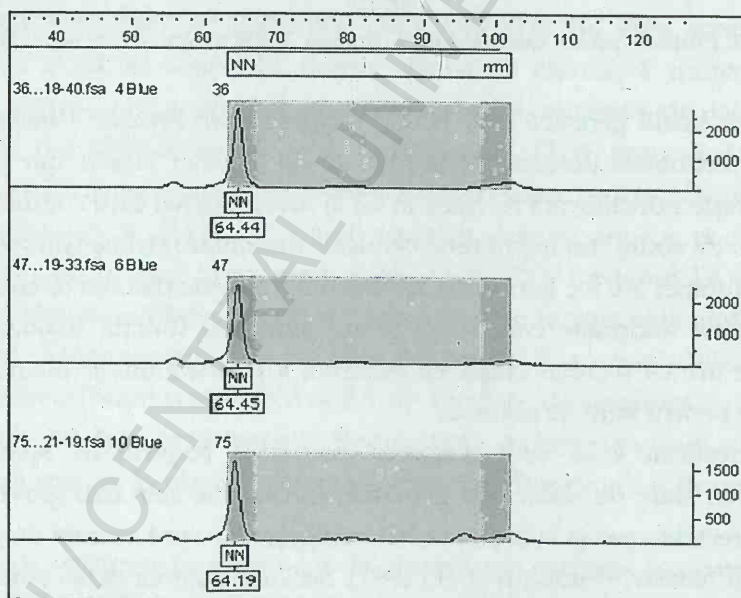


Figura 82. Profilele pentru trei exemplare din rasa Huțul diagnosticate normale pentru HYPP.

JEB (*Junctional Epidermolysis Bullosa*) este tot o maladie autozomală cauzată de inserția unei citozine la nivelul genei *LAMC2* (*Laminin subunit gamma-2*) care codifică subunitatea $\gamma 2$ a lamininei 5, proteină implicată în adeziunea celulară. Inserția duce la decalarea cadrului de citire și la sinteza unei proteine defecte (Milenkovic et al., 2003). Boala a fost descoperită la rase de cai de tracțiune din Franța și Belgia. Se

manifestă prin apariția unor joncțiuni dermo-epidermale anormale care au drept consecință o fragilitate excesivă a tegumentului și mucoaselor. Indivizii homozigoți recesivi nu supraviețuiesc mai mult de două săptămâni. Indivizii heterozigoți purtători ai genei defecte nu manifestă simptomele bolii, dar o pot transmite în descendență. În acest caz este foarte importantă punerea la punct a unei metode de diagnostic molecular în vederea eliminării eventualilor indivizi purtători.

Pentru a pune la punct o metodă de diagnostic au fost folosiți primeri care flanchează regiunea care poate conține inserția, primerul sens fiind marcat cu colorantul fluorescent 6-FAM. Producții de amplificare sunt supuși ulterior electroforezei capilare cu detecție în fluorescență, în prezența unui standard de masă moleculară. Pentru stabilirea diagnosticului este analizat profilul produșilor de amplificare. Un individ homozigot normal prezintă un singur semnal cu mărimea de 169 pb, iar unul heterozigot purtător are două semnale la 169 pb, respectiv 170 pb, datorită inserției citozinei (Figura 83). Dacă individul analizat este homozigot recesiv se evidențiază un singur semnal la 170 pb (Georgescu et al., 2008).

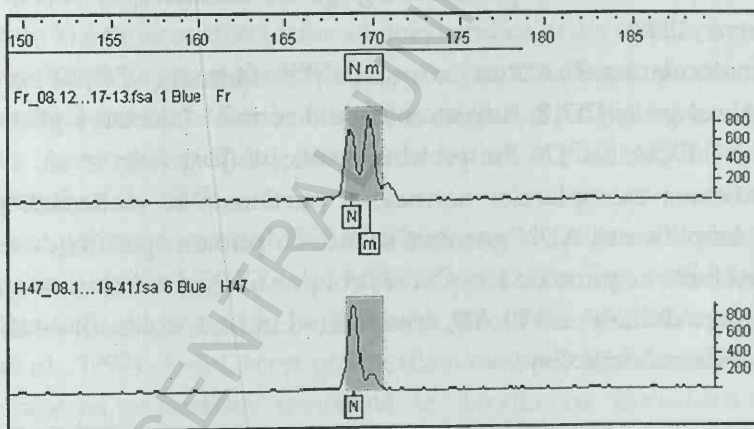


Figura 83. Profilele pentru două exemplare din rasa Trait Comtois și Semigreu Românesc diagnosticate ca purtător, respectiv normal pentru JEB.

VI.2.2 Diagnosticarea maladiilor genetice prin tehnica PCR-RFLP

Deficiența de adeziune leucocitară bovină (BLAD – *Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency*) este o boală autozomală recesivă congenitală caracterizată prin infecții recurente bacteriene, întârzierea vindecării, creștere încetinită și asocierea cu neutrofilie. Baza moleculară a BLAD o reprezintă o mutație punctiformă la nivelul

genei codificatoare pentru proteina CD18 (*Integrin beta-2*) astfel încât neutrofilele bovinelor afectate prezintă o expresie scăzută a integrinei β_2 (Jorgensen et al., 1993). Indivizii afectați prezintă ulcere severe la nivelul membranelor mucoase orale, parodontoză severă, pierderea dinților, pneumonie cronică și diaree recurentă sau cronică.

BLAD este caracterizată prin scăderea drastică a nivelului de expresie al genei care codifică integrina heterodimerică β_2 (Gerardi, 1996). Integrinele sunt o familie de receptori de suprafață care mediază interacțiunile celulă-matrix extracelular și celulă-celulă. În familia integrinelor β_2 sunt incluse printre altele receptorul tip 3 (CR3) sau molecule de adeziune CD11/CD18, care joacă un rol esențial în apărarea celulei gazdă. Deoarece pentru funcționarea corectă a integrinelor β_2 este nevoie de asocierea intracelulară a subunităților CD11 și CD18, defectele la nivelul CD18 împiedică funcția tuturor integrinelor β_2 . La exemplarele afectate de BLAD s-a evidențiat un nivel scăzut al expresiei integrinelor leucocitare în cazul neutrofilelor izolate. Deficiența de adeziune leucocitară duce la scăderea capacității de apărare imunitară la nivelul mucoasei, iar bovinele afectate de BLAD manifestă infecții severe și dese ale mucoaselor: pneumonii, gingivite ulcerative, pierderea dinților etc. (Nagahata et al., 1997).

Baza moleculară a BLAD este o mutație punctiformă (A/G) la nivelul poziției 383 din ADNc al genei CD18. Această mutație determină înlocuirea glicinei cu acidul aspartic la nivelul poziției 128 din proteina codificată (Jorgensen et al., 1993, Gerardi, 1996). Identificarea exemplarelor normale și purtătoare se realizează prin tehnica PCR-RFLP. Amplificarea ADN genomic se face cu primeri specifici desemnați astfel încât să flancheze o regiune de 136 pb care conține și regiunea în care apare mutația punctiformă care declanșează BLAD, aceasta fiind inclusă în situsul de clivare pentru endonucleaza de restricție *Taq I*.

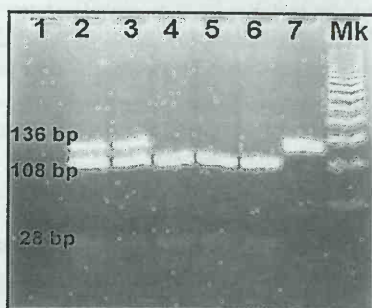


Figura 84. Ampliconi digerați cu enzima *Taq I*. 1: control negativ; 2, 3: indivizi heterozigoți; 4-6: indivizi homozigoți normali; 7: produs de amplificare nedigerat; 8: marker de masă moleculară 50pb (Promega).

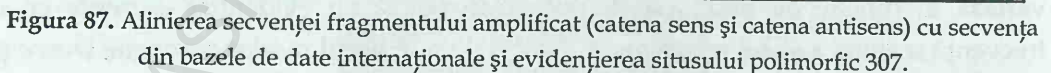
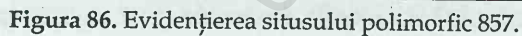
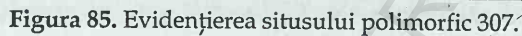
Pentru diagnosticarea deficienței de adeziune leucocitară bovină produsul PCR este supus digestiei cu enzima de restricție *Taq I* (Figura 84). Diferențele între bovinele afectate și cele sănătoase sunt evidențiate astfel: genotipul homozigot normal prezintă două benzi de 108 și 28 pb, cel heterozigot purtător trei benzi de 108, 28 și 136 pb, iar cel homozigot recesiv o singură bandă de 136 pb (Vătășescu-Balcan et al., 2006).

În industria creșterii suinelor, cele mai semnificative pierderi economice se datorează diferitelor boli ale animalelor. În cazul purceilor nou-născuți, cele mai comune sunt determinate de infecțiile cu bacteria *Escherichia coli*. Aceste infecții pot determina apariția unor maladii, cum ar fi diareea apoasă, acestea fiind asociate cu aderarea unor tulpini patogene de *Escherichia coli* la nivelul intestinului subțire (Rippinger et al., 1995).

O serie de cercetări s-au axat pe determinarea cauzei susceptibilității/rezistenței la infecțiile cu *Escherichia coli*. Un rol important îl au genele $\alpha 1,2$ fucoziltransferazelor, gene implicate în formarea structurilor oligozaharidice finale specifice antigenelor de grup sangvin (Bertschinger et al., 1993). La suine, au fost clonate și caracterizate două gene care codifică pentru $\alpha 1,2$ fucoziltransferaze (*fut1* și *fut2*) și s-au evidențiat două polimorfisme la nivelul cadrului deschis de lectură al *fut1*: M307 (G/A) și M857 (G/A) (Meijerink et al., 1997).

Studierea polimorfismului M307 la diferite rase de suine, a evidențiat faptul că animalele cu un genotip M307GG sau M307AG prezentau susceptibilitate la infecția cu *Escherichia coli* tulpina F18, în timp ce animalele M307AA erau rezistente (Meijerink et al., 1997). Astfel, acest polimorfism mononucleotidic poate fi utilizat ca marker în selecția animalelor rezistente la infecția cu *Escherichia coli*. Pentru polimorfismul M857 nu s-a evidențiat nicio asociere cu susceptibilitatea la infecții.

În ceea ce privește frecvența genotipurilor susceptibile/rezistente, acestea variază în funcție de rasă. Astfel, Bao et al. (2008) au evidențiat prezența cu o frecvență scăzută a alelei rezistente (M307^{AA}) doar în cazul raselor europene Duroc și Pietran, în timp ce în cazul raselor de suine native din China a identificat doar animale care prezentau genotipuri susceptibile la infecția cu *Escherichia coli* F18 (M307^{GG} și M307^{AG}). Meijerink et al. (1997) raportaseră o frecvență scăzută a genotipului rezistent M307^{AA} în cazul suinelor din rasa Duroc, Hampshire, Pietran, Marele Alb și Landrace, iar Klukowska et al. (1999) au analizat patru rase de suine poloneze și au evidențiat o frecvență de până la 63% a genotipurilor rezistente.



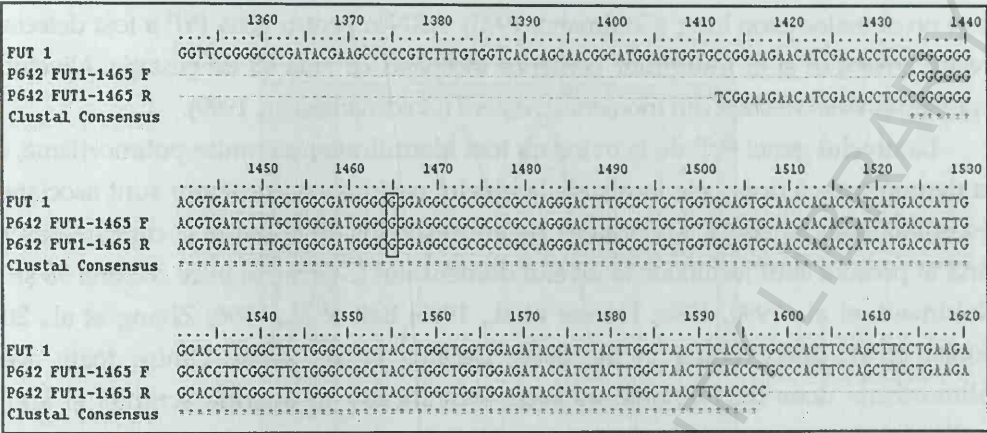


Figura 88. Alinierea secvenței fragmentului amplificat (catena sens și catena antisens), cu secvența din bazele de date internaționale și evidențierea situsului polimorfic 857.

Pentru certificarea rezultatelor secvențele pot fi comparate prin aliniere cu secvența genei *fut1* existentă în GenBank (U70883). În figurile 87 și 88 sunt prezentate alinierea realizate între secvențe obținute în laborator și secvențe din bazele de date internaționale.

Rezultatele prezentate demonstrează că acest test molecular poate fi foarte util în identificarea suinelor susceptibile la infecții și eliminarea acestora din programele de selecție.

VI.2.3 Diagnosticarea maladiilor genetice prin tehnica Real-Time PCR

Un alt exemplu de boli genetice cu implicații majore asupra efectivelor de animale de fermă sunt encefalopatiile spongiforme transmisibile. Studiul mecanismele moleculare asociate acestora este foarte important datorită efectului fatal asupra animalelor de importanță economică. În țările membre ale Uniunii Europene este aplicată o directivă care impune existența unui plan de monitorizare a scrapiei folosind genotiparea și realizarea programelor de selecție pe baza rezistenței la această boală. Ca urmare a acestei norme a fost observată o scădere semnificativă a animalelor afectate.

Procesul care declanșează boala Scrapie este reprezentat de conversia unei proteine normale, sensibilă la proteaze, sintetizată în mod natural în creierul tuturor mamiferelor (PrP^c), într-una mutantă, anormală, rezistentă la proteoliză, (PrP^{Sc}), marker specific encefalopatiilor spongiforme. Această modificare are loc doar după ce proteina prionică a fost ancorată la nivelul membranei celulare (Bossers et al., 1999).

În cazul ovinelor, gena PrP este localizată la nivelul cromozomului 13 (Castiglioni et al., 1998) și este formată din doi exoni scurți care regiunea 5' netradusă de 52, respectiv 98

pb și un al treilea exon lung (Goldmann, 1993). ARNm pentru gena PrP a fost detectat la nivelul creierului și al țesuturilor periferice începând cu ziua 98 de gestație. Nivelul de expresie rămâne constant din momentul nașterii (Goldmann et al., 1999).

La nivelul genei PrP de la ovine au fost identificate mai multe polimorfisme, dar s-a demonstrat că doar cele localizate la nivelul regiunii codificatoare sunt asociate cu susceptibilitatea la boală. Majoritatea polimorfismelor de la ovine și caprine descrise până în prezent sunt localizate la nivelul domeniului C-terminal între codonii 98 și 234 (Goldmann et al., 1990, 1996; Hunter et al., 1995; Belt et al., 1996; Zhang et al., 2004; Moum et al., 2005; Wang et al., 2008; DeSilva et al., 2003). Dintre toate aceste polimorfisme doar trei variante au efect semnificativ în apariția scrapiei și anume modificări ale aminoacizilor alanină cu valină la nivelul codonului 136, arginină cu histidină pentru codonul 154 și glutamina cu arginina/histidina la codonul 171 (A136V, R154H, Q171R/H). În tabelul 6 sunt prezentate sintetic polimorfismele la nivelul genei PrP și clasele de risc asociate acestora în cazul ovinelor.

Determinarea genotipului prin tehnica *Real Time PCR* este posibilă prin analiza curbelor de topire generate în urma obținerii ampliconilor (Kevorkian et al., 2011). De exemplu, genotipul ARH/ARQ la nivelul codonului 171 este asociat cu un risc mediu de dezvoltare a bolii (Clasa 3 de risc), iar exemplarele la care este identificat acesta necesită atenție în momentul în care sunt selectate pentru împerechere (Figura 89).

Tabel 6. Genotipurile PrP și încadrarea lor în clase de risc la ovine (Hrincă et al., 2014).

Clasă de risc	Grad de rezistență	Genotip PrP
Clasa 1	cel mai rezistent tip la scrapie	ARR/ARR
Clasa 2	rezistent din punct de vedere genetic, dar necesită atenție în momentul împerecherii	ARR/ARQ
		ARR/AHQ
		ARR/ARH
Clasa 3	puțină rezistență la scrapie și necesită atenție în momentul împerecherii	ARQ/ARH
		ARQ/AHQ
		AHQ/AHQ
		ARH/ARH
		AHQ/ARH
Clasa 4	susceptibil din punct de vedere genetic, nu ar trebui folosite la împerechere	ARR/VRQ
		AHQ/VRQ
Clasa 5	foarte susceptibil, nu trebuie folosite la împerechere	ARH/VRQ
		ARQ/VRQ
		VRQ/VRQ

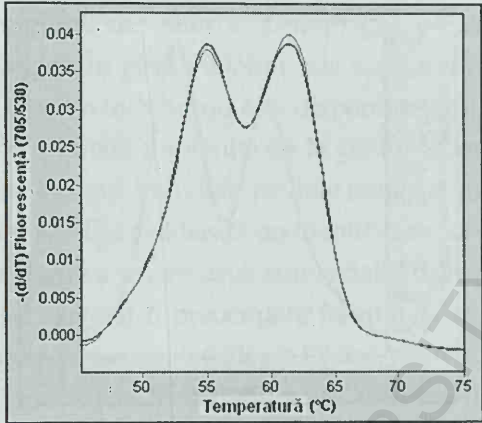


Figura 89. Profilul curbei de topire pentru un genotip ARH/ARQ la nivelul codonului 171.

În figurile 90 și 91 sunt prezentate genotipurile ARR/ARQ, respectiv ARR/ARH care fac parte din clasa 2 de risc. Animalele incluse în această clasă sunt genetic rezistente la scrapie, prezentând un nivel scăzut de dezvoltare a bolii, dar în funcție de genotipul animalelor cu care au fost împerecheate, progeniturile prezintă grade diferite de risc.

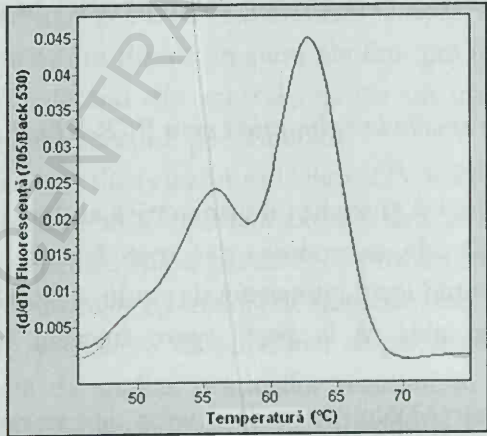


Figura 90. Profilul curbei de topire pentru un genotip ARR/ARQ la nivelul codonului 171.

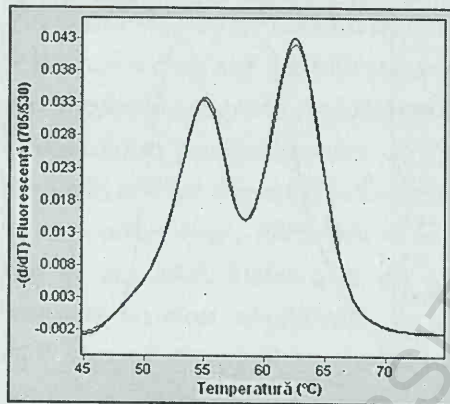


Figura 91. Profilul curbei de topire pentru un genotip ARR/ARH la nivelul codonului 171.

Susceptibilitatea la scrapie este determinată de o serie de factori legați de vârsta sau genotipul animalului, de rasă și doză de infecție. Utilizarea metodelor de biologie moleculară permite identificarea animalelor susceptibile pentru a dezvolta scrapia și totodată încadrarea exemplarelor în clasele de risc specifice.

VI.3 Identificarea speciilor și hibridilor interspecifici cu ajutorul tehnicilor de biologie moleculară

VI.3.1 Identificarea de specie la salmonide prin PCR-RFLP

Descrierea morfologică și analiza morfometrică au fost primele tehnici folosite pentru a defini speciile de salmonide, dar metodele de biochimie și biologie moleculară și-au găsit rapid locul între astfel de studii, înlăturând dubiile legate de o clasificare corectă, mai ales că la pești apare frecvent fenomenul hibridizării interspecifice.

ADN mitocondrial (ADNmt) posedă o serie de caracteristici specifice, ca de exemplu organizarea într-un genom compact, lipsa recombinării datorită transmiterii uniparentale (moștenire pe linie exclusiv maternă), o rată de evoluție rapidă. Totodată, probabilitatea recuperării ADNmt din probe biologice foarte mici sau degradate este mai mare decât în cazul ADN nuclear deoarece moleculele de ADNmt sunt prezente în mii de copii per celulă, comparativ cu ADN nuclear care se găsește

în două copii per celulă. Toate aceste caracteristici, dar și numărul mare de polimorfisme regăsit la nivelul secvențelor nucleotidice din două zone cu hipervariabilitate ale regiunii de control (*D-loop*) pot permite discriminarea între indivizi sau probe biologice. În plus, ADNmt este moștenit numai pe linie maternă, astfel încât, în cazul în care un individ nu este disponibil pentru o comparație directă cu o probă biologică, orice probă provenită de la genitorul matern, poate constitui o probă de referință. Deoarece toți indivizii, pe linie maternă prezintă aceeași secvență de ADNmt, aceasta nu poate fi considerată un identificator unic.

Salmonidele sunt pești cu importanță comercială mare și creșterea intensivă în condiții de acvacultură a devenit o preocupare însemnată în multe țări. Ca urmare, este importantă cunoașterea caracteristicilor ADNmt pentru identificarea stocurilor, studiul variabilității genetice a populațiilor și analiza filogeniei moleculare a salmonidelor (Phillips și Oakley, 1997).

Regiunea mitocondrială de control reprezintă regiunea reglatoare a genomului mitocondrial al vertebratelor, implicată în inițierea replicării ADN pe catena H, și conține secvențe promotor pentru transcripție (Saccone et al., 1991).

În cazul mai multor specii de salmonide, structura regiunii de control este bogată în citozină. Câteva secvențe ale regiunii *D-loop* prezintă un anumit grad de variație între populațiile aceleiași specii, dar variabilitatea nu este uniformă și regiunea de control mitocondrială prezintă anumite zone bine conservate în seria vertebratelor (Sbisa et al., 1997). O variabilitate amplă a zonei *D-loop* a fost evidențiată la *Salmo trutta* din diferite regiuni ale Europei (Bernatchez et al., 2001; Apostolidis et al., 2007), făcând din această regiune un important marker pentru identificarea și diferențierea speciilor de salmonide.

Identificarea se poate realiza cu ajutorul tehnicii PCR-RFLP (Dudu et al., 2011a). Inițial se amplifică o regiune mitocondrială extinsă, care cuprinde regiunea *D-loop*, dar și gene codificatoare pentru ARNr și ARNt, cu primeri specifici, urmată în pasul al doilea de digestia ampliconilor cu enzima de restricție *Hinf I* (Figurile 92-93).

În urma analizei se observă că scindarea ampliconilor cu endonucleaza de restricție *Hinf I*, urmată de analiza produșilor rezultați în gel de agaroză, poate identifica diferențele dintre diferitele specii de salmonide. Tehnica poate fi utilizată cu succes în identificarea moleculară a diferitelor specii de salmonide dar nu este eficientă pentru depistarea hibridilor dintre diferite specii.

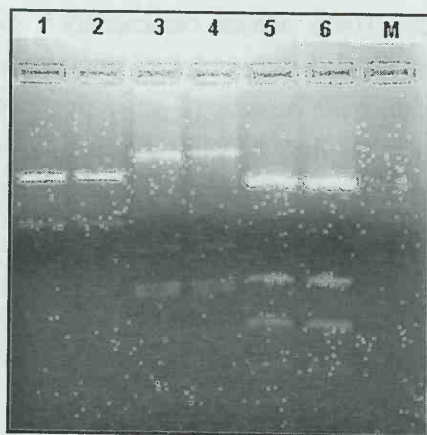


Figura 92. Electroforeză în gel de agaroză pentru evidențierea produșilor reacției de restricție cu *Hinf I* pentru regiunea mitocondrială extinsă la 3 specii de salmonide. M – Marker de masă moleculară 100 pb (Promega); 1, 2 – *Salvelinus fontinalis*; 3, 4 – *Hucho hucho*; 5, 6 – *Thymallus thymallus*.

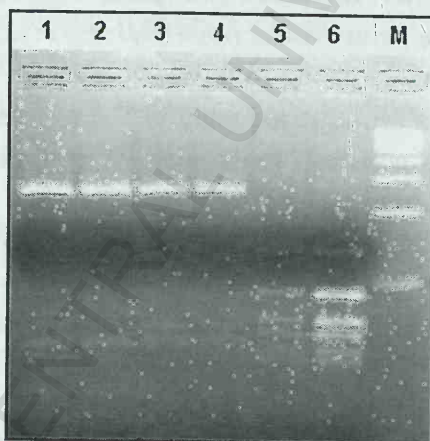


Figura 93. Electroforeză în gel de agaroză pentru evidențierea produșilor reacției de restricție cu *Hinf I* pentru regiunea mitocondrială extinsă la 3 specii de salmonide. M – Marker de masă moleculară 100 pb (Promega); 1, 2 – *Salmo labrax*; 3, 4 – *Salmo trutta*; 5, 6 – *Onchorhynchus mykiss*.

VI.3.2 Identificarea de specie la acipenseride prin PCR-RFLP

Aceeași metodă poate fi utilizată și pentru identificarea diferitelor specii de sturioni. Pentru identificarea corectă au fost selectate trei enzime de restricție (*Rsa I*, *Ssp I* și *Tru 9 I*) care să acționeze asupra unui fragment din ADNmt care cuprinde genele codificatoare pentru ARN_t^{Glu}, respectiv citocrom b (Dudu et al., 2010). În urma

acțiunii endonucleazelor, la electroforeza în gel de agaroză, se obțin fragmente cu mărimile prezentate în tabelul 7.

Tabel 7. Mărimea fragmentelor obținute în urma digestiei fragmentului ARN_t^{Glu}/citocrom b cu enzime de restricție specifice.

Enzima de restricție / Specia	<i>Huso huso</i>	<i>Acipenser stellatus</i>
<i>Rsa I</i>	317 pb 112 pb 33 pb	462 pb
<i>Ssp I</i>	277 pb 185 pb	462 pb
<i>Tru9 I</i>	292 pb 95 pb 66 pb 9 pb	387 pb 66 pb 9 pb

La *Acipenser stellatus* în urma digestiei produsului PCR cu enzima de restricție *Tru9 I* se obțin trei fragmente de 387, 66 și 9 pb. La *Huso huso*, digestia produsului de amplificare cu enzima *Tru9 I*, determină apariția a patru fragmente, de 292, 95, 66 și 9 pb (Figura 94).

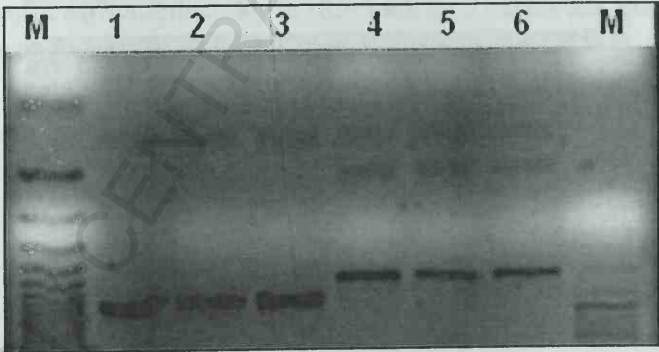


Figura 94. Profilul electroforetic după digestia fragmentului ARN_t^{Glu}/ citocrom b cu endonucleaza *Tru9 I* la *Acipenser stellatus* și *Huso huso*. M - marker de masă moleculară 50 pb (Promega); 1, 2, 3 - *Acipenser stellatus*; 3, 4, 5 - *Huso huso*.

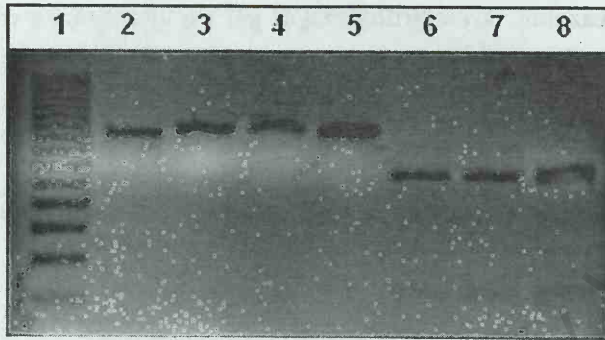


Figura 95. Profilul electroforetic după digestia fragmentului ARN^t_{Glu}/citocrom b cu endonucleaza *Rsa I* la *Acipenser stellatus* și *Huso huso*. 1 – marker de masă moleculară 50 pb (Promega); 2, 3, 4, 5 – *Acipenser stellatus*; 6, 7, 8 – *Huso huso*.

La *Huso huso* în urma digestiei produsului PCR cu enzima *Rsa I* s-au obținut trei fragmente, de 317, 112 și 33 pb. La *Acipenser stellatus*, fragmentul ARN^t_{Glu}/citocrom b a rămas intact după incubarea cu *Rsa I* deoarece această enzimă nu prezintă situsuri de restricție pentru această specie (Figura 95).

Tot la *Huso huso*, digestia produsului PCR cu enzima de restricție *Ssp I* determină apariția a două benzi de 217 și 185 pb, iar la *Acipenser stellatus* s-a observat că această enzimă nu taie fragmentul ARN^t_{Glu}/citocrom b de 462 pb (Figura 96).

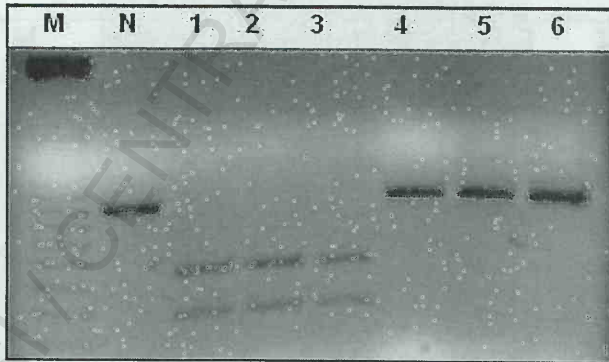


Figura 96. Profilul electroforetic după digestia fragmentului ARN^t_{Glu}/citocrom b cu endonucleaza *Ssp I* la *Acipenser stellatus* și *Huso huso*. M– marker de masă moleculară 50 pb (Promega); N - produs PCR netăiat; 1, 2, 3 – *Huso huso*; 4, 5, 6 – *Acipenser stellatus*.

Detectarea hibridilor în mediul natural ar reprezenta o realizare majoră în susținerea eforturilor de conservare a fondului piscicol.

VI.3.3 Identificarea hibrizilor interspecifici cu ajutorul markerilor ADN

Identificarea corectă a speciilor de sturioni este foarte importantă din mai multe motive. Astfel, pentru evitarea fraudelor comerciale este necesară o identificare precisă a speciilor de la care provin produsele comercializate, în special, caviarul. Principalele tipuri de caviar sunt beluga, osetra și sevruga, produse de *Huso huso* (morun), *Acipenser gueldenstaedtii* (nisetru) și *Acipenser stellatus* (păstrugă). Aceste tipuri de caviar diferă prin gust, preț și disponibilitate pe piață, tocmai de aceea apărând adesea încercări de fraudă.

Un alt scop al identificării speciilor de sturioni, este reprezentat de garantarea protecției acestor specii periclitate, aceasta constituind primul pas în derularea programelor de conservare. În condițiile reducerii semnificative, până la dispariție, a populațiilor sălbatice de sturioni, a devenit din ce în ce mai frecventă practica repopulării fluviilor cu indivizi obținuți prin reproducere artificială și crescuți până la o anumită vârstă în condiții de acvacultură. În acest context, este necesară o identificare corectă, și din punct de vedere genetic, a indivizilor care urmează să fie eliberați în fluvii pentru a evita repopularea cu hibrizi.

Hibridizarea interspecifică la vertebrate reprezintă un fenomen mai puțin frecvent datorită incompatibilității genetice a genoamelor parentale (Arnold, 1997) și, în general, acești hibrizi nu sunt viabili. Chiar dacă hibrizii de acest tip ar supraviețui, aceștia ar fi sterili datorită dezvoltării incomplete a gonadelor. Hibrizii viabili manifestă un mix de trăsături morfologice moștenite de la ambele specii parentale.

La pești și la unii amfibieni, hibridizarea se petrece mult mai frecvent decât în cazul altor grupe de vertebrate. Datorită anumitor caracteristici, ca de exemplu, poliploidia, speciile de sturioni hibridizează mult mai ușor decât alte specii de pești (Birstein et al., 1997). Este bine cunoscut faptul că sturionii hibridizează atât în mediul natural, în principal datorită suprapunerii în timp și în spațiu a zonelor de reproducere, cât și în condiții de acvacultură, dând naștere unor hibrizi intergenerici sau interspecifici viabili și uneori fertili.

Până la ora actuală, identificarea hibrizilor s-a realizat pe baza caracterelor morfometrice ținând seama că aceștia moștenesc caracteristici morfologice de la ambele specii genitoare. Cu toate acestea, identificarea unui anumit individ ca hibrid pe baza morfologiei nu este suficientă și devine cu adevărat dificilă atunci când sunt implicate trei specii, cum este cazul hibridului rezultat din încrucișarea besterului (hibridul *Huso huso* x *Acipenser ruthenus*) cu *Acipenser gueldenstaedtii*. Mai mult,

identificarea juvenilor hibridi bazată numai pe date morfometrice s-a dovedit a fi mult mai dificilă decât identificarea adulților hibridi și, în aceste condiții, numai un studiu genetic poate oferi dovada că markeri ADN de la ambele specii parentale se întâlnesc la specia hibridă.

Identificarea speciilor de pești pe baza unor metode moleculare reprezintă un subiect de mare interes pe plan internațional. În acest sens a fost dezvoltată o rețea științifică, FISH-BOL (*Fish Barcode of Life Initiative*), care își propune crearea unei baze de date cu secvențe ADN de referință pentru toate speciile de pești. Astfel, un fragment de 648 pb din regiunea 5' a genei mitocondriale care codifică pentru subunitatea I a citocrom oxidazei a fost propus drept „cod de bare” pentru identificarea speciilor de vertebrate. Analiza acestui fragment prin secvențializare a condus la apariția tehnicii cunoscută sub denumirea de *DNA barcoding*.

Un alt marker mitocondrial utilizat cu succes pentru identificarea speciilor de pești este gena mitocondrială care codifică pentru citocrom b (*cyt b*). Astfel analiza prin PCR-RFLP a genei *cytb* a fost propusă ca o metodă moleculară de identificare a speciilor de sturioni și implicit a provenienței loturilor de caviar de pe piață.

Identificarea speciilor prin PCR-RFLP sau prin *DNA barcoding*, deși eficientă pentru alte specii pești, s-a dovedit incertă în cazul acipenseridelor. Analiza unor markeri moleculari mitocondriali prezintă neajunsul că genomul mitocondrial este moștenit pe linie maternă și astfel înregistrează variabilitatea genetică care provine de la genitorul matern. Acest fapt poate conduce la interpretări greșite în identificarea hibridilor și/sau în cazul unei introgresii foarte vechi, ambele fenomene fiind întâlnite la sturioni și raportate în literatură (Ludwig et al., 2003).

Pentru o identificare precisă a unui individ ca fiind un hibrid interspecific, este necesară o analiză genetică care să dovedească prezența unor markeri nucleari de la ambele specii genitoare. Markerii moleculari cu moștenire mendeliană reprezintă o soluție foarte bună pentru a detecta hibridizarea și permit caracterizarea indivizilor ca aparținând unor specii pure sau hibridi. Dintre aceștia, microsateliții pot fi foarte utili în identificarea hibridilor de sturioni, luând în considerare că alelele unui individ reprezintă o combinație a alelelor parentale.

Microsateliții (STR - *Short Tandem Repeats*) sunt secvențe repetitive scurte care se repetă în tandem, necodante, cu o lungime variabilă și cu un înalt grad de polimorfism (Beckmann și Weber, 1992). Microsateliții sunt distribuiți omogen în genom pe toți cromozomii și pe toate regiunile cromozomale, iar polimorfismul ridicat al acestora comparativ cu alți markeri genetici este bazat pe diferența de mărime datorată numărului variabil de repetiții de la un anumit locus.

Stabilirea corectă a genotipului indivizilor la nivelul unor loci microsatelitari este îngreunată în cazul acipenseridelor de caracterul poliploid al acestor specii. Astfel, Vasili'ev (2009) propune două scale de estimare a gradului de ploidie la sturioni:

i. o scală evolutivă conform căreia speciile diploide sunt considerate extinse, speciile cu 120 de cromozomi, tetraploide, cele cu 250, octaploide și cele cu peste 370 de cromozomi, 12-ploide;

ii. o scală contemporană conform căreia speciile cu 120 de cromozomi sunt funcțional diploide, cele cu 250 de cromozomi sunt considerate tetraploide, iar cele cu peste 370 de cromozomi, hexaploide.

Scala contemporană este cel mai des luată ca referință în ceea ce privește nivelul de ploidie al speciilor actuale de sturioni.

Având în vedere considerentele expuse anterior, o etapă importantă a diagnosticului molecular al speciilor și hibrizilor interspecifici de sturioni utilizând microsateliți este cea referitoare la selecția locilor utilizați în studiu. Metoda moleculară propusă de Dudu et al. (2011b) pentru identificarea speciilor și hibrizilor de sturioni de Dunăre presupune analiza unui număr de opt microsateliți (LS19, LS34, LS39, LS54, Aox27, AoxD234, AnacB4 și AnacC11) la indivizi aparținând speciilor morun, păstrugă, cegă (~120 cromozomi) și nisetru (~240 cromozomi).

Locii selectați au fost amplificați prin reacții PCR multiplex, iar identificarea alelelor prezente la nivelul fiecărui locus s-a realizat prin tehnica de analiză a fragmentelor marcate fluorescent. Pentru amplificarea locilor microsatelitari au fost utilizați primeri specifici regiunii care flanchează zona cu unități repetitive, primerul sens fiind marcat cu un fluorocrom specific. După amplificarea prin PCR, fragmentele marcate obținute sunt supuse, concomitent cu un standard de masă moleculară, unei electroforeze capilare cu detecție în fluorescență.

Cei opt microsateliți selectați funcționează ca loci disomici (cu două alele/locus) în cazul speciilor *Huso huso*, *Acipenser stellatus* și *Acipenser ruthenus*. Unii dintre aceștia prezintă însă un profil polisomic (până la patru alele/locus) la specia tetraploidă *Acipenser gueldenstaedtii*, ceea ce face dificilă estimarea corectă a genotipurilor. Aceasta se traduce în necesitatea obținerii datelor despre dozajul alelic.

O modalitate de aflare genotipului în cazul analizei unor loci cu caracter polisomic, propusă de Jenneckens et al. în 2001, este aceea de a realiza un raport între ariile semnalelor înregistrate de analizorul genetic. Calculul este necesar mai ales atunci când sunt prezente un număr mai mic decât numărul maxim de alele per individ, dar din păcate în cazul microsateliților cu caracter polisomic, această

determinare este susceptibilă interpretării eronate. De exemplu, în figura 97 este prezentată electroforegrama obținută în urma analizei locusului AoxD234 la nisetru. Conform electroforegramei pentru proba analizată sunt înregistrate trei semnale, iar raportul între ariile lor este de circa 1:1:1. Determinarea corectă a genotipului pe baza dozajului alelic este în acest caz deficitară deoarece nu este posibilă identificarea alelei prezente în dublu exemplar, dat fiind caracterul tetrasomic al locusului.

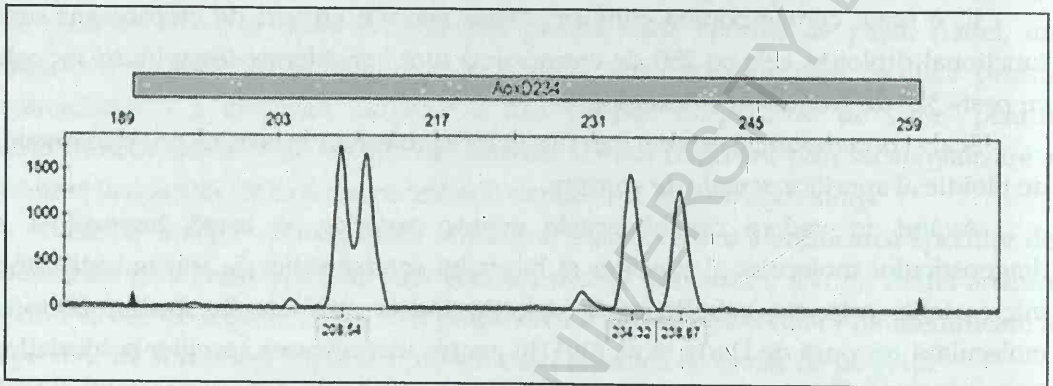


Figura 97. Electroforegrama locusului tetrasomic AoxD234 la *Acipenser gueldenstaedtii*.

Pentru identificarea speciilor/hibridilor pe baza analizei microsateliților nu este necesară determinarea genotipurilor "reale" când avem de-a face cu loci tetrasomici. Pe de altă parte, nu există nici o metodă statistică care să permită analiza datelor tetrasomice împreună cu cele disomice și de aceea genotipurile polisomice sunt organizate ca fiind disomice.

De exemplu, dacă un individ prezintă pentru un anumit locus trei alele A, B și C, se consideră pentru acest individ trei genotipuri disomice (AB, BC și AC), cu scopul de a analiza datele fără a pierde informația alelică.

Calculul frecvențelor alelice și identificarea alelelor de diagnostic

Autorii au constatat că numărul alelelor observate pentru fiecare dintre cei opt loci selectați a variat între 1 și 8 la păstrugă, 2-11 la morun, 1-8 la nisetru și 1-5 la cegă (Tabel 8).

Tabel 8. Caracteristicile celor opt loci microsatelitari selectați pentru identificarea speciilor și hibrizilor la sturioni.

Locus	Mărimea alelelor (bp)				Numărul total de alele			
	Păstrugă	Morun	Nisetru	Cegă	Păstrugă	Morun	Nisetru	Cegă
LS19	133-145	133-163	133-157	136-142	5	9	7	3
LS34	148	142-148	142	139-145	1	2	1	2
LS39	96	105-114	105-108	102-108	1	4	2	3
LS54	140-192	220-252	196-215	152-160	8	7	6	2
Aox27	126-146	122-134	114-150	118	6	4	5	1
AoxD234	203-247	195-251	207-271	219-271	6	11	8	5
AnacE4	346-358	332-360	326-360	326-332	6	6	7	3
AnacC11	153-193	145-173	165-189	161-201	6	3	4	5
Număr total					39	46	40	24

Autorii au calculat frecvențele alelice și au fost identificate alelele particulare (alele care apar numai în cadrul uneia dintre speciile analizate) care prezintă valoare de alele de diagnostic. Alelele de diagnostic sunt alele fixe în populația respectivă și sunt distribuite într-un interval larg de frecvență, de la 0,01 la 1 (Tabel 9).

Tabel 9. Alele de diagnostic și frecvențele acestora calculate pentru populațiile de sturioni din Dunăre.

Locus	Mărimea (pb)	Păstrugă	Morun	Nisetru	Cegă
LS19	140	0	0	0,0128	0
	145	0,0238	0	0	0
	151	0	0,0476	0	0
	154	0	0,0952	0	0
	160	0	0,4286	0	0
	163	0	0,0476	0	0
LS34	139	0	0	0	0,0313
	145	0	0	0	0,9688
Aox27	114	0	0	0,4605	0
	118	0	0	0	1
	122	0	0,1905	0	0
	142	0,1429	0	0	0
	146	0,1905	0	0	0
	150	0	0	0,0263	0
LS54	140	0,0476	0	0	0
	152	0	0	0	0,9375
	164	0,0952	0	0	0

	172	0,0476	0	0	0
	176	0,0952	0	0	0
	184	0,2143	0	0	0
	188	0,2619	0	0	0
	192	0,0476	0	0	0
	196	0	0	0,2308	0
	204	0	0	0,2051	0
	208	0	0	0,2308	0
	212	0	0	0,3077	0
	215	0	0	0,0128	0
	220	0	0,0952	0	0
	232	0	0,0714	0	0
	236	0	0,2619	0	0
	240	0	0,0714	0	0
	248	0	0,0952	0	0
	252	0	0,2619	0	0
LS39	96	1	0	0	0
	102	0	0	0	0,0625
	111	0	0,0714	0	0
	114	0	0,0476	0	0
AnacE4	346	0,1905	0	0	0
	348	0,2143	0	0	0
	354	0,1905	0	0	0
AoxD234	195	0	0,0238	0	0
	199	0	0,0238	0	0
	203	0,1429	0	0	0
	211	0	0,0238	0	0
	223	0,1905	0	0	0
	231	0	0	0,0278	0
	235	0,2857	0	0	0
	239	0	0,0476	0	0
	243	0	0,0714	0	0
AnacC11	145	0	0,4048	0	0
	153	0,125	0	0	0
	161	0	0	0	0,25
	189	0	0	0,2162	0
	193	0,025	0	0	0
	201	0	0	0	0,0625

Inițial a fost propusă utilizarea alelelor unice ca markeri pentru identificarea hibridilor. Această metodă presupune însă analiza unui număr semnificativ de indivizi din speciile parentale pentru a avea certitudinea unui diagnostic corect.

Analiza statistică a datelor genotipice

a) Analiza multidimensională (Analiza Factorială de Corespondență - FCA)

Cu scopul de a investiga relațiile existente între indivizii analizați se poate efectua o analiză factorială de corespondență (*Factorial Correspondence Analysis*) utilizând programul Genetix (Belkiri et al., 1996). Acest tip de analiză este capabilă să explice maximum de variație genetică folosind un număr minim de factori și permite vizualizarea relațiilor genetice existente între specii/populații.

Inițial se efectuează o analiză de tip FCA numai pe baza datelor genotipice provenind de la indivizii considerați ca aparținând unor specii pure. Aceasta evidențiază diferențele existente între cele patru specii analizate. Astfel, au fost identificate patru cluster, fiecare aparținând uneia dintre speciile analizate. Axa cea mai informativă este axa 1 (10,41% din totalul variației genetice), care separă cele patru specii, dar mai ales *Acipenser stellatus* de celelalte trei specii. Cea de-a doua axă este mai puțin informativă (9,81%) și separă *Huso huso* și *Acipenser ruthenus*, fiind urmată de axa a treia care separă în special *Huso huso* de *Acipenser gueldenstaedtii* și conține 7,11% din variația genetică totală (Figura 98).

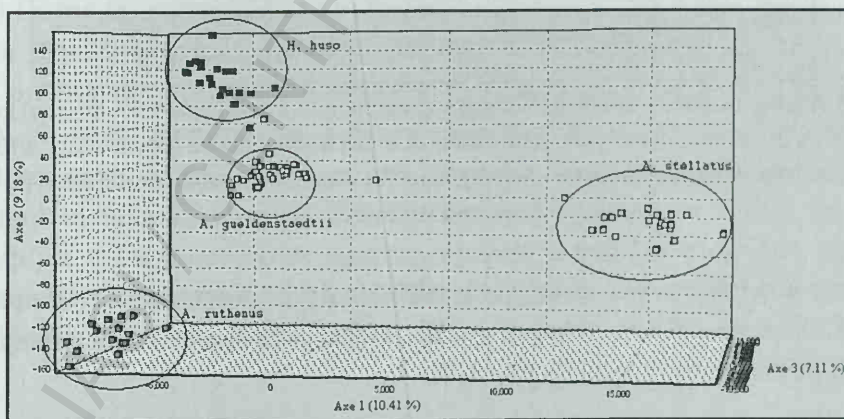


Figura 98. Analiza factorială de corespondență bazată pe opt microsateliți în cazul indivizilor aparținând celor patru specii pure de sturioni din Dunăre (Dudu et al., 2015).

Unii dintre indivizii analizați, clasificați pe baza morfologiei ca aparținând unor specii pure, s-au situat în afara clusterelor corespunzătoare speciilor de care aparțin.

Acesta poate constitui un prim indiciu că indivizii au fost greșit identificați, și că de fapt reprezintă hibrizi a căror origine trebuie testată.

În a doua etapă, datele genotipice ale indivizilor caracterizați ca fiind hibrizi în urma analizei morfometrice au fost incluse în analiza factorială de corespondență ca indivizi suplimentari (care nu influențează calculul informației genetice distribuite pe axe). Analiza a evidențiat un al cincilea cluster, care cuprinde hibrizii, dar și indivizi care au fost încadrați taxonomic greșit pe baza caracterelor morfologice și meristice (Figura 99). În urma analizei multidimensionale a indivizilor analizați, numai trei dintre cele patru specii apar ca fiind implicate în hibridizare, presupușii hibrizi ocupând o poziție intermediară între morun, păstrugă și nisetru. Din acest motiv, în următoarele etape ale analizei FCA, datele genotipice obținute pentru reprezentanții speciei *Acipenser ruthenus* au fost eliminate.

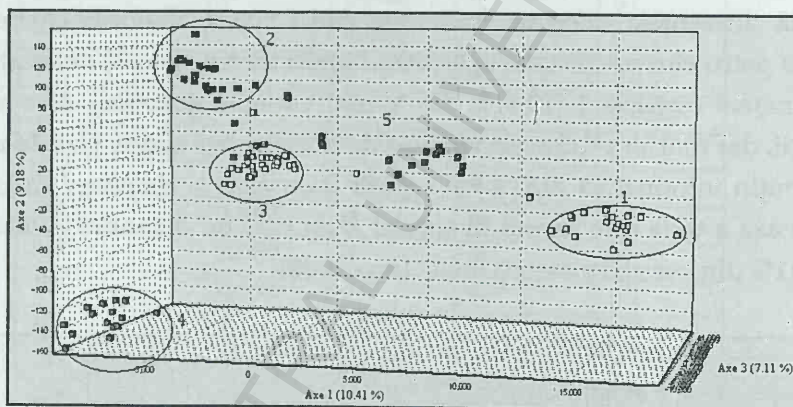


Figura 99. Analiza factorială de corespondență bazată pe opt loci microsatelitari în cazul indivizilor aparținând celor patru specii pure și hibrizilor de sturioni din Dunăre (Dudu et al., 2015). (1) - *Acipenser stellatus*; (2) - *Huso huso*; (3) - *Acipenser gueldenstaedtii*; (4) - *Acipenser ruthenus*; (5) - Hibrizi și indivizi puri.

Într-o altă etapă a fost realizată o analiză de tip FCA pentru indivizi aparținând speciilor *Acipenser stellatus*, *Acipenser gueldenstaedtii* și *Huso huso*, caracterizați ca puri și hibrizii pe baza morfologiei (Figura 100).

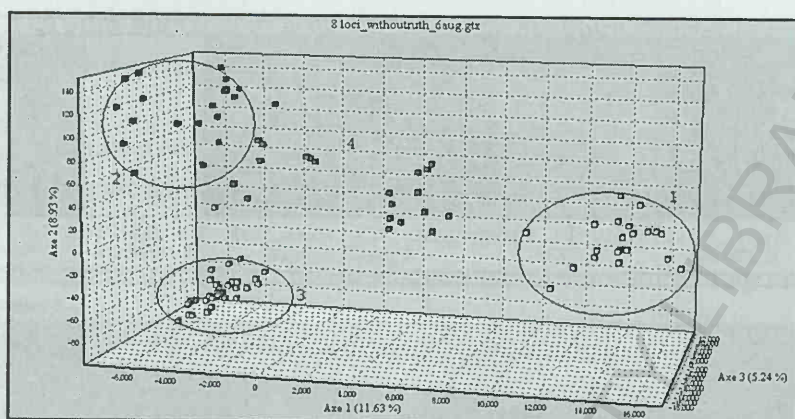


Figura 100. Analiza factorială de corespondență bazată pe opt loci microsatelitari în cazul indivizilor aparținând a trei specii pure și hibridilor de sturioni din Dunăre (Dudu et al., 2015). (1) - *Acipenser stellatus*; (2) - *Huso huso*; (3) - *Acipenser gueldenstaedtii*; (4) - Hibridi și indivizi puri.

În urma analizei FCA, speciile pure și hibridii au fost separate în cluster distincte. Hibridii și unii dintre indivizii considerați ca fiind puri pe baza caracterelor morfologice au ocupat o poziție intermediară între cele trei grupuri corespunzătoare speciilor pure. Unii dintre aceștia au fost plasați aproximativ în mijlocul triunghiului delimitat de clusterelor speciilor pure, în timp ce alții apar ca fiind mai apropiați de *Huso huso* și *Acipenser gueldenstaedtii*.

b) Testul de atribuire cu STRUCTURE

Cu ajutorul programului STRUCTURE v2.1 (Pritchard et al., 2000) se poate realiza un test de atribuire a indivizilor unei anumite categorii (specie pură sau hibridi), pe baza genotipurilor acestora. Identificarea clusterelor corespunzătoare fiecărei categorii se face pe baza unui algoritm de tip *bayesian* implementat în programul menționat. Dacă analiza se efectuează pentru un număr de cluster (populații) $k = 1-4$ (numărul de specii pure luate în analiză în studiu), 500.000 de repetiții *burnin*, 1.000.000 de iterații *Markov Chain Monte Carlo* (MCMC) și 10 replicare pentru fiecare valoare a parametrului k .

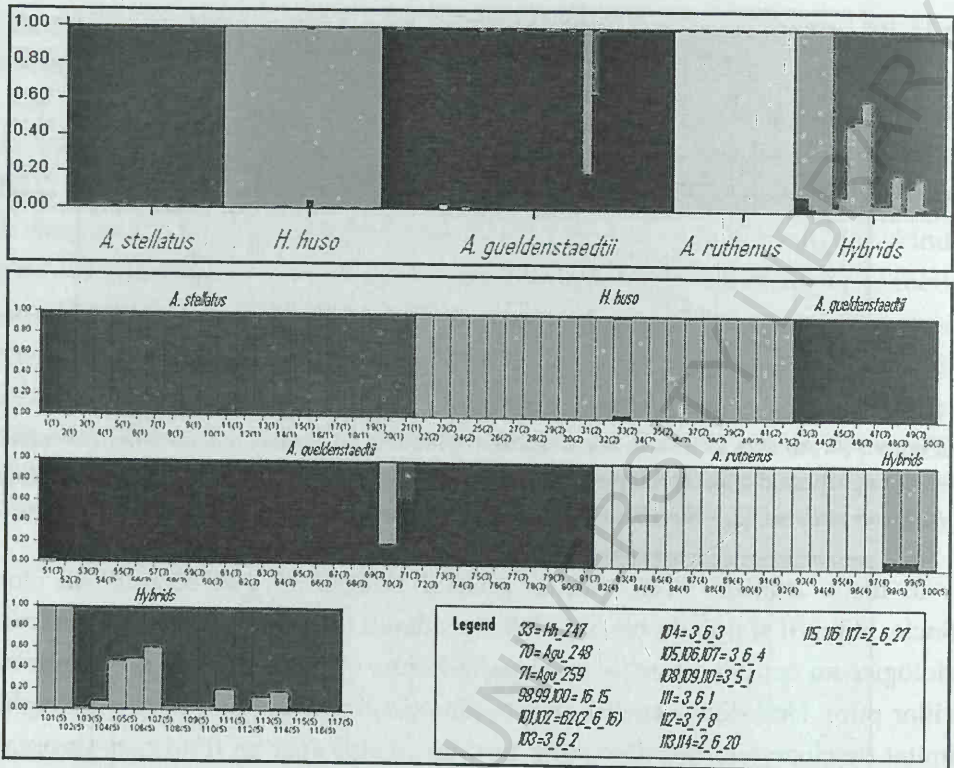


Figura 101. Rezultatele analizei efectuate cu STRUCTURE pe baza a opt loci microsatelitari în cazul a patru specii de sturioni din Dunăre și a hibridilor acestora. Reprezentarea grafică a coeficientului de apartenență Q (Dudu et al., 2015).

Testul de atribuire a relevat prezența a cinci cluster: (1) specia pură *Acipenser stellatus*, (2) specia pură *Huso huso*; (3) specia pură *Acipenser gueldenstaedtii*; (4) specia pură *Acipenser ruthenus* și (5) clusterul hibridilor.

Anumiți indivizi clasificați drept hibrizi pe baza caracterelor morfologice apar ca fiind indivizi puri conform analizei de atribuire. Indivizii puri sunt repartizați cu precizie în clusterelor corespunzătoare speciilor de proveniență. Similar analizei multidimensionale, testul de atribuire a arătat că specia *Acipenser ruthenus* nu a fost implicată în formarea hibridilor analizați (Figura 101).

Valorile coeficientului de apartenență (*membership coefficient* - Q) în cazul indivizilor puri, pentru 10 treceri independente, sunt foarte asemănătoare și valoarea medie a lui Q pentru clusterelor reprezentând speciile pure este mai mare de 0,98. Indivizii Hh_247 (Q=0,94), Agu_248 (Q=0,211) și Agu_259 (Q=0,643) au prezentat valori ale coeficientului de atribuire mai mici decât 0,95, conducând la ipoteza că

acești indivizi sunt hibrizi și în acest caz testul de atribuire realizat în STRUCTURE este în concordanță cu rezultatul analizei factoriale de corespondență.

c) Determinarea categoriilor hibride

Hibrizii confirmați de analizele statistice descrise mai sus pot fi analizați împreună cu speciile lor genitoare cu programul NewHybrids, care calculează probabilitatea posterioară ca un hibrid să aparțină unei anumite categorii (generație F1, F2 sau *backcross*).

Un prim test a inclus *Acipenser stellatus*, *Huso huso* și hibrizii rezultați din încrucișarea acestora. Au fost calculate probabilitățile posterioare pentru fiecare individ ca acesta să aparțină uneia dintre categoriile: *Acipenser stellatus* (specie pură), *Huso huso* (specie pură), F1, F2, *backcross* 1 (hibrid rezultat din încrucișarea unui hibrid din generația F1 cu specia parentală *Acipenser stellatus*) sau *backcross* 2 (hibrid rezultat din încrucișarea unui hibrid din generația F1 cu specia parentală *Huso huso*).

Pentru indivizii considerați pe baza caracterelor morfologice ca aparținând celor două specii au fost obținute valori ale probabilității posterioare mai mari de 0,97, adică există o probabilitate cel puțin egală cu 97% ca aceștia să fie puri. În ceea ce privește hibrizii rezultați între cele două specii, în urma analizei efectuate s-a constatat că 37,5% dintre aceștia aparțin generației F1, iar restul de 62,5% au fost plasați în categoria *backcross* 1, adică se consideră că au rezultat în urma încrucișării unui hibrid de generație F1 cu *Acipenser stellatus* (Tabel 10).

Tabel 10. Valorile probabilităților posterioare calculate pentru hibrizii rezultați din încrucișarea *Acipenser stellatus* și *Huso huso*.

Hibrizi	Morun	Păstrugă	F1	F2	Bc1	Bc2
3_6_2	0	0,00008	0,6806	0,03201	0,00092	0,28638
3_6_3	0	0,00001	0,1172	0,17105	0,00007	0,71163
3_6_4	0	0	0,9586	0,0213067	0,01073	0,009347
3_5_1	0	0,00003	0,8193	0,0145667	0,00116	0,164987
3_6_11	0	0,00001	0,2034	0,11948	0,00011	0,67697
3_7_8	0	0,00233	0,0061	0,29325	0,00008	0,69821
2_6_20	0	0,001385	0,3076	0,193425	0,00078	0,496845
2_6_27	0	0,015626667	0,244	0,08054	0,00032	0,65951

Cel de-al doilea test a inclus reprezentanții speciilor pure *Acipenser gueldenstaedtii* și *Huso huso* și hibrizii acestora. În cazul majorității indivizilor aparținând speciei *Huso huso* s-au obținut valori ale probabilității posterioare mai

mari de 0,97, ceea ce semnifică că există o probabilitate mai mare de 97% ca acești indivizi să fie puri. Au fost observate însă și excepții care au prezentat valori mai scăzute ale probabilității posterioare (aproximativ 0,88). Pentru acești indivizi considerați drept puri pe baza morfologiei, analizele moleculare au dovedit că de fapt sunt hibrizi interspecifici. Atât analiza factorială de corespondență, cât și testul de atribuire cu STRUCTURE au sugerat ca indivizii respectivi prezintă genotipuri compozite, fapt ce sugerează caracterul hibrid al acestora.

În cazul indivizilor considerați pe baza descrierii morfologice ca aparținând speciei *Acipenser gueldenstaedtii* a fost observată o probabilitate posterioară de cel puțin 98%, cu excepția individului Agu_248 care a fost plasat în categoria *backcross 2* (adică este rezultatul încrucișării unui hibrid de generație F1 dintre *Acipenser gueldenstaedtii* și *Huso huso* cu specia parentală *Huso huso*) cu o probabilitate de 0,634 (Tabel 11).

Tabel 11. Valorile probabilității posterioare pentru *Acipenser gueldenstaedtii*, *Huso huso* și hibrizii acestora.

	<i>Acipenser gueldenstaedtii</i>	<i>Huso huso</i>	F1	F2	Bc1	Bc2
Hh_247	0,000	0,878	0,000	0,004	0,000	0,119
Hh_276	0,000	0,880	0,000	0,000	0,000	0,120
Hh_278	0,000	0,855	0,000	0,001	0,000	0,144
Agu_248	0,017	0,155	0,013	0,168	0,014	0,634
16_15	0,000	0,462	0,000	0,014	0,000	0,523

Cel de-al treilea test a inclus speciile *Acipenser stellatus*, *Acipenser gueldenstaedtii* și un presupus hibrid rezultat din încrucișarea celor două specii, clasificat ca atare în urma analizei datelor genotipice prin metodele menționate anterior. Probabilitatea ca indivizii incluși în analiză să fie puri este mai mare de 97%, cu excepția individului Agu_259 care a fost plasat în categoria F2 cu o valoare a probabilității posterioare de 0,99, ceea ce semnifică faptul că există o proporție de 99% ca acesta să fie un hibrid de generație F2 între cele două specii (Tabel 12).

Tabel 12. Valorile probabilității posterioare pentru *Acipenser stellatus*, *Acipenser gueldenstaedtii* și hibrizii rezultați din încrucișarea acestora.

	<i>Acipenser stellatus</i>	<i>Acipenser gueldenstaedtii</i>	F1	F2	Bc1	Bc2
Agu_259	0,001	0,006	0,000	0,990	0,000	0,003
2_6_27a	0,978	0,000	0,000	0,008	0,014	0,000

Rezultatele analizei datelor genotipice prin cele trei metode statistice succesive au evidențiat că, în majoritatea cazurilor, clasificarea cu ajutorul markerilor moleculari a fost în concordanță cu clasificarea realizată pe criterii morfologice.

Totuși, au fost înregistrate și anumite excepții, care nu fac decât să confirme necesitatea unei metode de identificare a speciilor și hibridilor pe baza datelor moleculare. Spre exemplu, clasificarea individului Agu_248 pe baza criteriilor morfologice ca fiind pur și aparținând speciei *Acipenser gueldenstaedtii* nu a fost confirmată de analiza moleculară. Conform analizei multidimensionale, individul Agu_248 este plasat în același cluster cu indivizii caracterizați morfologic ca fiind hibridi și ocupă o poziție intermediară între clusterelor corespunzătoare speciilor *Huso huso* și *Acipenser gueldenstaedtii*. Analiza realizată folosind programul STRUCTURE a arătat că acest individ este caracterizat de valorile coeficientului de apartenență Q de 0,211 pentru *Acipenser gueldenstaedtii* și 0,783 pentru *Huso huso*, ceea ce semnifică că în compoziția genotipului acestuia participă în proporție de 21% specia *Acipenser gueldenstaedtii* și în proporție de 78% specia *Huso huso*. În urma analizei realizate cu programul NewHybrids, acest individ a fost plasat în categoria backcross 2, cu o valoare a probabilității posterioare de 0,634, ceea ce semnifică că a rezultat prin încrucișarea unui hibrid de generație F1 dintre *Acipenser gueldenstaedtii* și *Huso huso* cu specia parentală *Huso huso*. Acest fapt este confirmat și testul bayesian de atribuire realizat cu STRUCTURE, probabilitățile obținute în cazul Agu_248 fiind de aproximativ 25% - *Acipenser gueldenstaedtii* / 75% - *Huso huso*.

Ținând cont că ADNmt este moștenit exclusiv pe linie maternă, pentru exemplarul respectiv a fost analizat prin secvențializare markerul mitocondrial *D-loop* cu scopul identificării speciei materne care a participat la formarea lui. Secvența ADN obținută pentru un fragment din regiunea de control mitocondrială a fost comparată cu cele existente în baza de date GenBank Database utilizând funcția BLAST care permite identificarea similarităților dintre secvențe. Pentru secvența *D-loop* obținută pentru individul Agu_248, cea mai mare omologie (98%) a fost observată cu secvența AJ249675, care reprezintă un fragment din regiunea *D-loop* de la specia *Huso huso*. Rezultatele obținute dovedesc caracterul hibrid al individului Agu_248, care a fost clasificat incorect pe baza criteriilor morfologice ca aparținând speciei *Acipenser gueldenstaedtii*. Analizele moleculare au clasificat acest individ ca fiind un hibrid obținut prin încrucișarea unei femele aparținând speciei *Huso huso* cu un mascul hibrid *Acipenser gueldenstaedtii* x *Huso huso*.

Metoda bazată pe markeri nucleari microsateliți poate fi îmbunătățită prin analiza unui număr mai mare de loci pentru mai mulți indivizi de referință din speciile pure și poate constitui un instrument potrivit de identificare a hibrizilor.

VI.4 Analiza markerilor moleculari asociați cu caracterele morfo-productive la animale de fermă

Potențialele beneficii ale utilizării markerilor moleculari în programele de ameliorare ale speciilor de animale de interes economic, erau evidente încă dinainte de implementarea acestora în industria zootehnică. Cu toate acestea, introducerea acestora în selecția asistată de markeri moleculari (*Marker Assisted Selection*) era limitată de numărul mic de markeri existenți la jumătatea secolului XX. Odată cu dezvoltarea tehnicilor de biologie moleculară, după 1970, această situație s-a schimbat fiind identificate din ce în ce mai multe polimorfisme corelate cu diferite caracteristici morfo-productive de interes economic, având astfel loc o trecere de la selecția bazată exclusiv pe fenotip la selecția bazată atât pe fenotip cât și pe genotip.

Pentru a înțelege mai bine bazele genetice care controlează caracterele complexe este necesară o cunoaștere cât mai amănunțită a genelor și proceselor biochimice implicate în determinismul acestora. Cele mai utilizate metode de identificare și caracterizare a genelor implicate în determinismul caracterelor complexe sunt metoda QTL (*Quantitativ Trait Loci*) și metoda genelor candidate.

În cazul unei analize QTL se utilizează un număr mare de markeri genetici și hărți de linkage pentru a identifica regiuni de la nivelul cromozomilor care sunt corelate cu diferite caractere de interes. După identificarea regiunilor care conțin un QTL, analiza se concentrează asupra genelor de la acest nivel și corelarea lor cu procesele de interes.

Metoda genelor candidate pornește de la un număr apreciabil de gene care se presupune că ar avea un rol important în anumite procese biologice și se încearcă stabilirea unei corelații între acestea și trăsăturile de interes. Mai mult, pot fi alese ca gene candidate cele asociate cu regiuni care conțin un QTL (genă candidată pozițional), genele ortologe (gene care au fost corelate cu caracterele studiate la alte specii) sau genele exprimate diferențiat la nivelul țesuturilor studiate (Haley, 1999; Wilson et al., 2000).

VI.4.1 Analiza genelor asociate cu calitatea cărnii la suine

Dezvoltarea rapidă a populației la nivel global a crescut și necesarul de hrană, în special cel de carne. În acest context, în industria de creștere a suinelor, unul dintre cei mai importanți factori este reprezentat de prolificitate, și anume de numărul de purcei per fătare. În ultimii 20 de ani numărul de purcei per fătare a crescut considerabil, în special datorită unor modificări în procesul de selecție al animalelor, prin utilizarea femelelor din linii superioare precum și prin încrucișări între diferite rase, numărul variind între 2 și 20, cu o media între 9 și 11, în funcție de rasă (Johnson et al., 1999).

Odată cu realizarea hărților genetice s-au putut identifica și caracteriza genele implicate în reproducere. Totodată, dezvoltarea tehnicilor de biologie moleculară a permis realizarea tot mai multor studii de tip "gene candidate" pentru identificarea genelor corelate cu trăsături de importanță economică. Prin urmare, s-a evidențiat o asociere între o anumită alelă a genei care codifică receptorul estrogen (ER), la suine și numărul de purcei per fătare (Rothschild et al., 1996; Short et al., 1997).

Prima asociere dintre o genă candidată și numărul de purcei per fătare a fost dovedită de către Rothschild et al. în 1996. Acesta a evidențiat, în urma reacției de restricție a ADN genomic cu enzima *Pvu II*, un polimorfism al mărimii fragmentelor de restricție la nivelul genei *Ern*, situată pe cromozomul 1, corelat cu numărul de purcei per fătare. Rezultatele obținute de către Rothschild et al. (1996) au fost confirmate ulterior de către Short et al. (1997) și Chen et al. (2000). În aceste trei studii s-a evidențiat o asociere favorabilă între alela B și creșterea numărului de purcei per fătare, asociere observată pentru anumite rase de suine, dar și pentru unele linii sintetice.

Polimorfismul mononucleotidic, T1665C, determină apariția a două alele: A (T1665T), respectiv B (C1655C). În toate cele trei studii menționate mai sus s-a evidențiat o asociere favorabilă a alelei B cu creșterea numărului de purcei per fătare.

Prezența acestui polimorfism poate fi identificată prin tehnica PCR-RFLP (Manea et al., 2010). Pentru aceasta se desemnează primeri specifici cu ajutorul cărora se poate amplifica un fragment din gena receptorului estrogen (*er*), fragment care conține polimorfismul mononucleotidic T1665C. După amplificare, ampliconii sunt digerați cu enzima de restricție *Ava I*, deoarece prezența polimorfismului determină apariția unui situs nou de recunoaștere pentru această enzimă. În mod normal, la nivelul fragmentului amplificat există deja un situs de restricție pentru *Ava I*, astfel încât enzima va acționa la acest nivel indiferent de genotipul animalului analizat.

Putem considera acest situs ca fiind un situs control al eficienței reacției de digestie. Existența polimorfismului mononucleotidic (T1665C) determină apariția unui situs de restricție al enzimei *Ava I* putându-se astfel diferenția între exemplarele cu genotip homozigot (T1665T sau C1665C) și cele heterozigote (T1665C).

Pentru exemplarele cu un genotip heterozigot T1665C, în urma digestiei cu *Ava I*, se obțin patru benzi de 47, 60, 78 și 107 pb, deoarece o alelă prezintă două situsuri de restricție, iar cealaltă doar un singur situs, situsul control. Pentru exemplarele cu genotip C1665C, în urma digestiei cu enzima de restricție se evidențiază trei benzi de 47, 60 și 78 pb deoarece ambele alele prezintă două situsuri de restricție. În ceea ce privește animalele cu genotip T1665T, în urma digestiei produșilor PCR se obțin doar două benzi de 107 și 78 pb, deoarece există un singur situs de restricție (Figura 102).

Rezultatele obținute demonstrează că, aplicând această metodă, pot fi identificate cu ușurință animalele care prezintă alela favorabilă pentru reproducție. Prin urmare, această metodă poate fi aplicată de către crescători în selecția asistată de markeri.

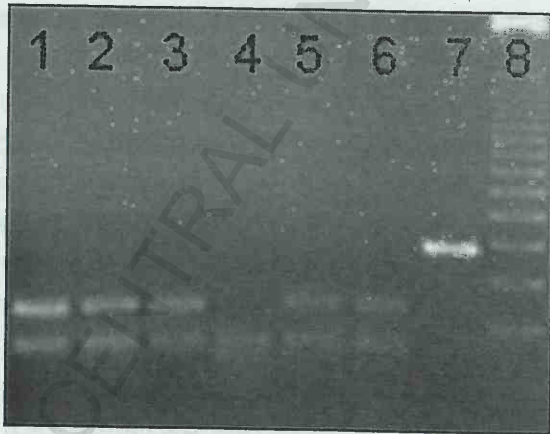


Figura 102. Profilele de restricție pentru genotiparea locusului receptorului Estrogen. 1, 3, 5, 6: genotip T1665T; 2: genotip T1665C; 4: genotip C1665C; 7: fragment netăiat; 8: marker de masă moleculară 50 pb (Promega).

O altă analiză moleculară se referă la diagnosticul hipertermiei maligne (HM). Aceasta este o maladie farmaco-genetică caracterizată prin accelerarea metabolismului țesutului muscular, rigiditate musculară și creșterea rapidă a temperaturii corpului. Boala este întâlnită și în cazul animalelor domestice, în special în cazul suinelor, având consecințe economice nedorite în întreaga lume (O'Brien et al., 1987). Suinele sunt rareori expuse anestezicelor, dar animalele homozigote

afectate de această tulburare reacționează la stres în același mod ca oamenii supuși anesteziei: rigiditate musculară, hipermetabolism, creșterea temperaturii corpului și într-o fază avansată poate surveni chiar decesul. În acest caz vorbim deja de "sindromul stresului porcin" (PSS). Aplicarea unui stres puternic înainte de sacrificare animalelor susceptibile determină obținerea de carne palidă, moale și exudativă (carnea PSE - *Pale Soft Exudative*).

Maladia este cauzată de o mutație punctiformă (C1843T) la nivelul genei care codifică RyR1 (*Ryanodine Receptor 1*), mutație care determină înlocuirea cisteinei cu arginină. Incidența HM la suine variază de la o rasă la alta și de la o țară la alta, estimându-se că aproximativ 10% dintre animalele crescute în scopuri comerciale ar fi heterozigote purtătoare, iar 1,5% homozigote afectate (Seeler et. al., 1983). Până la 12% dintre animalele homozigote afectate mor datorită PSS și până la 50% dintre carcasele animalelor homozigote sunt de calitate slabă, fiind de tip PSE.

Această incidență crescută a genei corelate cu HM se datorează faptului că gena mutantă prezintă atât efecte dăunătoare cât și benefice. Efectele benefice sunt asociate cu scăderea procentului de grăsime și cu o hipertrofie musculară, ceea ce determină o creștere cu 2-3% a procentului de masă musculară din carcasă (Webb et al., 1986). Deoarece programele de ameliorare a calității cărnii de porc s-au bazat, în special pe fenotip (conformație mare a jambonului, spată mare și creșterea procentului de țesut muscular), selecția animalelor a condus, în mod eronat, la o creștere a incidenței genei corelate cu HM în populațiile de suine.

Datorită efectelor acestei boli pentru sistemele de creștere intensivă apare necesitatea dezvoltării unei metode de diagnostic molecular în vederea identificării exemplarelor afectate sau purtătoare. Cu ajutorul tehnicii PCR-RFLP (Manea et al., 2008b) se poate amplifica un fragment de 274 pb din gena *RyR1*, fragment care conține situsul polimorfic la nivelul căruia apare mutația punctiformă C1843T. Prezența mutației modifică situsul de restricție al endonucleazei *Hha I*.

După amplificare, produșii PCR sunt digerați cu enzima de restricție și supuși electroforezei în gel de agaroză 3%. Numărul și mărimea benzilor obținute depinde de genotipul animalului testat: homozigot normal, heterozigot sau homozigot afectat, determinând apariția a una, două sau trei benzi. În cazul unui animal homozigot normal (NN) se obțin două benzi de 123 și 149 pb, iar pentru un homozigot recesiv (nn) se obține o singură bandă la 272 pb (enzima nu scindează fragmentul amplificat). În cazul unui heterozigot purtător (Nn) se obțin trei benzi de 123, 149 și 272 pb (Figura 103).

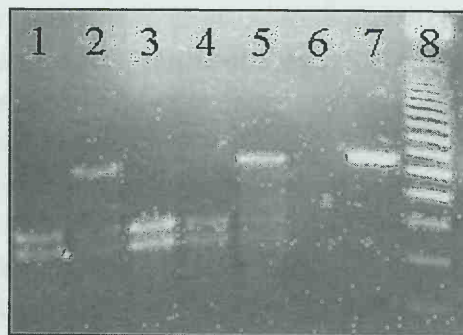


Figura 103. Profilele de restricție pentru genotiparea locusului receptorului Rhyandodin. 1, 3, 4: genotip NN; 2, 5: genotip Nn; 7: fragment netăiat; 8: marker de masă moleculară 50 pb (Promega).

Astfel, cu ajutorul tehnicilor de biologie moleculară se poate stabili o metodă utilă în implementarea unei metodologii de selecție asistată de markeri bazată pe identificarea animalelor heterozigote purtătoare în scopul eliminării acestora din programele de selecție ulterioare.

VI.4.2 Analiza genelor implicate în determinismul culorii robei la cabaline

Negru, roib și cenușiu sunt culorile de bază cel mai des întâlnite la aproape toate rasele de cai. Aceste culori ale robei apar în urma interacțiilor dintre trei gene, iar pentru variațiile și diluțiile de culoare mai există încă nouă gene implicate (Bowling, 2000). Dintre toate rasele de cai cunoscute numai Pur Sânge Englez, Arab și Lipișan pot fi caracterizate de o anumită culoare a exemplarelor. Toate celelalte rase prezintă culori diferite de la un individ la altul.

În cazul raselor caracterizate de o culoare particulară, cum este de exemplu rasa Lipișan, este foarte importantă analiza locilor implicați în determinismul culorii robei în vederea unei selecții artificiale de calitate și a identificării de genotipuri corespunzătoare sub acest aspect.

La mamifere, melanina este principalul pigment din corp. Ea apare sub formă de granule la nivelul unor celule specializate numite melanocite. În cazul adulților, melanocitele se găsesc în foliculii firului de păr, piele, iris și în alte țesuturi. Variațiile de culoare ale robei sunt datorate unor gene care, prin activitatea lor, alterează culoarea pigmentului din melanocite sau prezența, forma, numărul ori aranjamentul granulelor de pigment. Melanina apare în două forme: eumelanina, de culoare neagră sau brună, și pheomelanina, de culoare roșie sau galbenă. La cai, se consideră

că genele care controlează echilibrul dintre eumelanină și pheomelanină, producând astfel culorile de bază castanie și neagră, apar la nivelul locilor *Extension* și *Agouti*.

Astfel, receptorul pentru melanocortină (MC1R), codificat de gena *MC1R* (locusul *Extension*), și peptida sa antagonistă, proteina de semnalizare *Agouti* (*ASIP* - *Agouti Signaling Protein*), codificată de gena *ASIP* (locusul *Agouti*), controlează cantitatea și tipul de melanină din melanocite. *ASIP* este antagonist al MC1R deoarece blochează activitatea hormonului stimulator al melanocitelor (α -MSH - α -*Melanocyte-Stimulating Hormone*). Blocarea activității MC1R duce la producerea eumelaninei în detrimentul pheomelaninei și deci, la apariția culorii negre (Rieder et al., 2001).

Culoarea neagră la cai este destul de rară și apare numai în cazul în care gena *ASIP* este în stare homozigot recesivă (aa). În prezența alelei dominante (A) pigmentul negru apare distribuit numai în anumite zone cum ar fi coada sau partea inferioară a picioarelor. Prezența alelei recesive (a) duce la uniformizarea culorii negre a părului pe întreg corpul. Acțiunea este completă numai în prezența genotipurilor dominante (EE sau Ee) pentru gena *MC1R*. Alela recesivă apare datorită unei deleții de 11 pb la nivelul secvenței normale aceasta ducând la modificarea cadrului de citire și apoi la sinteza unei proteine defective (Rieder et al., 2001).

Culoarea roibă apare la cai tot în urma interacției dintre genele *ASIP* și *MC1R*. Astfel, Marklund et al. au descoperit în 1996 o mutație la nivelul genei *MC1R* care duce la sinteza unei proteine receptor defective. Această proteină este parte din membrana melanocitelor și are rolul de a lega hormonul stimulator al melanocitelor. Acesta are rolul de a stimula producerea de eumelanină în detrimentul pheomelaninei. În cazul apariției mutației proteina receptor este defectivă și nu-și mai poate îndeplini rolul biologic, deci nu mai are loc legarea hormonului stimulator și nici producerea de eumelanină. În consecință are loc producerea și acumularea de pheomelanină la nivelul melanocitelor și apariția culorii roibe.

Mutația responsabilă de toate aceste modificări este tranziția unei citozine la timină, fapt care duce la înlocuirea fenilalaninei din secvența normală de aminoacizi cu serina. Această înlocuire afectează primul domeniu transmembrantar al proteinei receptor. Deci pentru apariția culorii roibe este necesară prezența genotipului ee la nivelul locusului *Extension* și Aa sau AA la nivelul locusului *Agouti*.

Pentru stabilirea genotipurilor de la nivelul locusului *Agouti* se poate utiliza tehnica analizei fragmentelor marcate fluorescent (Georgescu et al., 2010). În acest scop se desemnează primeri care să flancheze regiunea unde poate apărea deleția de 11 pb de la nivelul genei *ASIP*. Primerul sens a fost marcat cu colorantul fluorescent 6-FAM. Se realizează reacția PCR iar produșii de amplificare sunt supuși apoi unei

electroforeze capilare cu detecție în fluorescență, în prezența unui standard de masă moleculară. Pentru stabilirea genotipurilor exemplarele testate se analizează profilul produșilor de amplificare. Genotipul homozigot normal prezintă un singur semnal cu mărimea de 96 pb, cel heterozigot are două semnale la 96 pb și la 85 pb, iar cel homozigot recesiv un singur semnal la 85 pb.

Pentru stabilirea genotipurilor de la nivelul locusului *Extension* se folosește tehnica PCR-RFLP (Georgescu et al., 2009). Se desemnează primeri care să flancheze regiunea unde poate apărea mutația punctiformă de la nivelul genei *MC1R*, iar ampliconii sunt supuși digestiei enzimatică cu endonucleaza de restricție *Taq I*. Produșii de restricție sunt ulterior analizați folosind electroforeza în gel de agaroză. Situsul de restricție pentru *Taq I* este T/CGA. În cazul alelei prezentei alelei E nu există un situs activ de restricție pentru *Taq I*, iar fragmentul amplificat rămâne intact și are lungimea de 459 pb. În cazul alelei e are loc înlocuirea citozinei cu timină și activarea unui situs de restricție pentru *Taq I* ceea ce duce la clivarea fragmentului inițial în două fragmente de 184, respectiv 275 pb.

În urma analizelor moleculare ale unor exemplare de cabaline au fost identificate genotipurile EE și Ee pentru locusul *Extension* și genotipurile aa și Aa pentru locusul *Agouti* (Figurile 104 și 105).

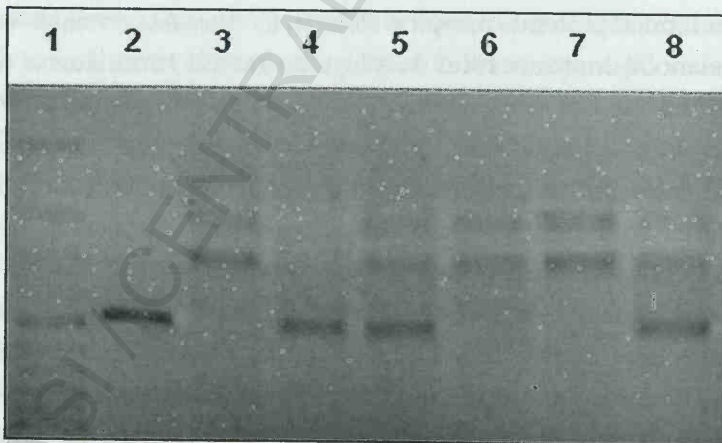


Figura 104. PCR-RFLP pentru analiza locusului *Extension*: 1 – marker de masă moleculară 100 pb (Promega); 2 – fragment netăiat; 3, 6, 7 – genotip ee; 4 – genotip EE; 5, 8 – genotip Ee.

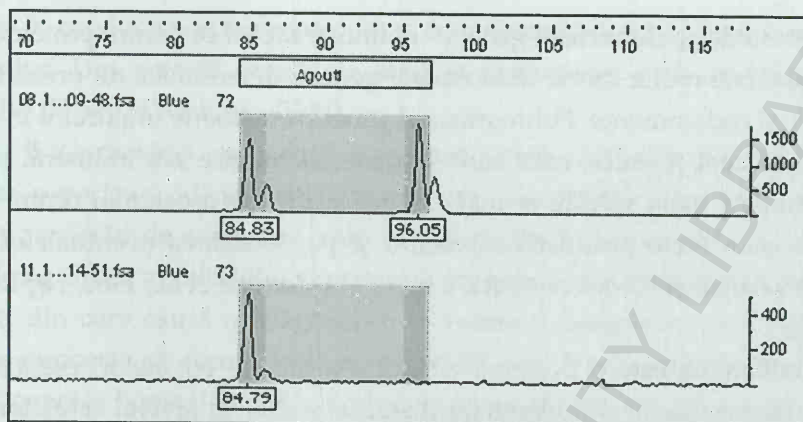


Figura 105. Genotipurile Aa și aa pentru locusul *Agouti*.

VI.4.3 Analiza moleculară a locilor asociați cu calitatea laptelui la bovine

Identificarea markerilor moleculari și corelarea acestora cu caracterelor morfo-productive ale raselor de taurine prezintă un interes major pentru cercetarea biologică și zootehnică.

Proteinele din lapte sunt de obicei împărțite în mai multe grupe în funcție de comportamentul lor la acidifiere. Frațiunea solubilă, numită proteina din zer, este constituită din diferite proteine, dintre care cele mai importante sunt α -lactalbumina (α -La) și β -lactoglobulina (β -Lg).

Cazeinele sunt fosfoproteine care au ca grupare prostetică fosforilserina sau fosforiltreonina. Grupul cazeinelor din lapte este format din patru tipuri majore: α s1-Cn, α s2-Cn, β -Cn și k-Cn, aceste proteine fiind asociate cu un număr variabil de grupări fosfat (Sharp și Nicholas, 2014). Cazeinele α s1-, α s2- și β - sunt mai bogate în grupări fosfat și se disting de k-cazeina prin tendința lor de a precipita în prezența ionilor de calciu.

Cazeina k este formată din două fragmente diferite din punct de vedere al solubilității: unul dintre acestea este caracterizat prin prezența reziduurilor hidrofobe, celălalt manifestă o natură hidrofilă accentuată. Datorită acestor proprietăți, cazeina k are rolul de protector față de celelalte cazeine și formează împreună cu ele o dispersie în lapte prin formarea de miceli, fiecare dintre acestea fiind formate din câteva mii de molecule din toate cele patru cazeine (Ng-Kwai-Hang et al., 1990).

Termenul de „polimorfism genetic” definește faptul că fiecare proteină din lapte are două sau mai multe forme determinate genetic determinate de prezența alelelor autozomale și codominante. Polimorfismul genetic este foarte important în domeniile cu directe aplicații practice, cum sunt științele zootehnice sau industria produselor lactate, studiile actuale axându-se mai ales pe clarificarea asocierilor dintre variantele genetice și caracterele productive, precum și pe detectarea eventualelor influențe asupra compoziției și valorii nutritive a laptelui (Marziali et al., 1986; Ng-Kwai-Hang et al., 1986).

α -lactalbumina este o proteină majoră din laptele bovinelor, esențială pentru biosinteza lactozei la nivelul glandelor mamare. Astfel, la nivelul celulelor epiteliale ale glandelor mamare, α -lactalbumina leagă β 1,4-galactoziltransferaza și conduce la sinteza formei active a enzimei lactosintaza. Mai departe enzima sintetizează lactoza care este eliberată în lapte împreună cu α -lactalbumina. Lactoza realizează o deshidratare a laptelui prin intermediul osmozei, condiționând astfel calitatea acestuia. Deci, putem afirma că, fiind direct implicată în sinteza lactozei, α -lactalbumina influențează calitatea și volumul laptelui. La nivelul regiunii reglatoare a genei α -lactalbuminei a fost descoperită o mutație punctiformă care duce la apariția a două variante genetice: A și B. Studiile au fost realizate pe mai multe rase de bovine iar varianta genetică A a fost descoperită până acum doar la rasa Holstein și este asociată cu o scădere semnificativă a producției de lapte (Sharp și Nicholas, 2014).

k-caseina și β -lactoglobulina sunt două dintre cele mai importante proteine din laptele mamiferelor. Proteinele sunt sintetizate de celulele epiteliale ale glandelor mamare și joacă un rol crucial în asigurarea calității laptelui. Ele joacă un rol important în coagularea laptelui, aspect esențial în producerea brânzeturilor și a untului, și conferă valoare nutrițională lactatelor. Procesul de coagulare este important și prin prisma faptului că asigură condițiile de bună absorbție a principiilor alimentare din lapte la nivelul tubului digestiv. k-caseina influențează procesul de coagulare a laptelui și conținutul proteic al acestuia. Până acum au fost descoperite 9 variante genetice care codifică forme diferite ale k-caseinei: A, B, C, E, F, G, H, I și J. Dintre acestea doar alelele A și B sunt întâlnite cu o frecvență mai mare în populațiile de bovine (Sharp și Nicholas, 2014).

Studiile realizate până acum ne arată că laptele care conține varianta B a k-caseinei prezintă proprietăți lactodinamografice mult crescute față de cel care conține varianta A. Formele A și B sunt cele mai răspândite în populațiile de taurine, în timp ce formele C și E sunt destul de rare. Frecvența crescută a tipurilor de alele A și B se datorează faptului că aceste două variante ale genei sunt asociate cu performanțe

superioare în producția de lapte precum și cu obținerea unei compoziții superioare a brânzeturilor. Din această cauză ele au fost promovate, prin selecție, în cadrul populațiilor (Sharp și Nicholas, 2014).

Alela B a k-caseinei este o formă mutantă a alelei A și este asociată cu un lapte de calitate superioară, deoarece conținutul său în caseină este mult mai mare și prezintă proprietăți de coagulare mult mai bune decât pentru alela A a k-caseinei. Timpul de agregare al miceliilor (timpul de coagulare sau închegare a laptelui) este mai scurt, din care cauză și frăgezimea și volumul coagulului sunt mai bune. În prezent se cunoaște că exemplarele care posedă alela B a k-caseinei, în doză dublă, numit și "genotip homozigot BB" produc un lapte de calitate superioară din care se obțin brânzeturi de cea mai bună calitate. Din aceasta cauză fermierii selectează exemplarele pentru reproducție după genotipul alelei k-caseinei (Sharp și Nicholas, 2014).

Anumite variante genetice de β -lactoglobulină sunt asociate cu prezența unui procent mare de caseină și grăsime în lapte. Până acum au fost descoperite 11 variante genetice care codifică forme diferite ale proteinei β -lactoglobulină, influențând astfel calitatea laptelui: A, B, C, D, E, F, G, H, I, J și W. Dintre acestea, variantele A și B prezintă cel mai mare interes, ele fiind asociate cu performanțele de producție a laptelui, cu calitatea și cu procesarea eficientă a acestuia (Sharp și Nicholas, 2014). Exemplarele homozigote BB furnizează un lapte bogat în grăsime și în proteine, foarte valoros în procesul de fabricare a brânzeturilor, în timp ce exemplarele homozigote AA, dau lapte cu un procent mic de grăsime, dar în cantitate mai mare (Sharp și Nicholas, 2014).

Cea mai uzuală metodă de diferențiere între genotipurile AA, BB și AB ale genei α -lactalbuminei o reprezintă scindarea cu endonucleaza de restricție *Mnl I* a ampliconilor obținuți prin amplificarea cu primeri specifici, desemnați la nivelul regiunii polimorfice (Vătășescu-Balcan et al., 2008).

Situsul de restricție al endonucleazei *Mnl I* este GAGG(N)₆↓, iar lungimea fragmentelor rezultate pentru diferitele genotipuri este de 78, 52 și 36 pb pentru genotipul AA, 114 și 52 pb pentru BB, respectiv 114, 78, 52 și 36 pb pentru genotipul heterozigot AB. În figura 106 este prezentat rezultatul unei reacții de restricție enzimatică pentru exemplare cu genotip BB.

În vederea analizei genotipurilor caracteristice pentru locii β -lactoglobulinei, respectiv k-caseinei se poate folosi tot tehnica PCR-RFLP (Vătășescu-Balcan et al., 2007). Restricția enzimatică a ampliconilor care conțin situsurile polimorfice se face cu endonucleazele *Hae III*, respectiv *Hinf I*. Lungimea fragmentelor de restricție

corespunzătoare diferitelor alele identificate este indicată în tabelul 13, iar în figurile 107 și 108 sunt prezentate spre exemplificare profilele de restricție pentru cei doi loci.

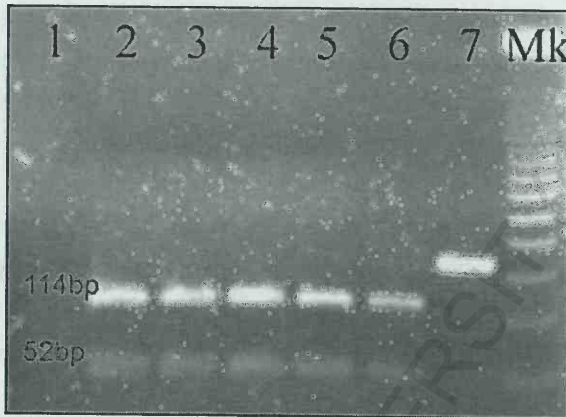


Figure 106. Electroforeză în gel de agaroză pentru evidențierea genotipurilor de la nivelul locusului α -lactalbuminei. 2-6: genotip BB; 7: marker de masă moleculară 50 pb (Promega).

Tabel 13. Lungimea fragmentelor de restricție obținute prin tehnica PCR-RFLP la analiza locilor β -lactoglobulinei și k-cazeinei la bovine.

Locus	Endonucleaza de restricție	Genotip AA	Genotip BB	Genotip AB
β -lactoglobulina	<i>Hae III</i>	153/109 pb	109/79 pb	153/109/79 pb
k-cazeina	<i>Hinf I</i>	134/84 pb	268/84 pb	266/134/84 pb

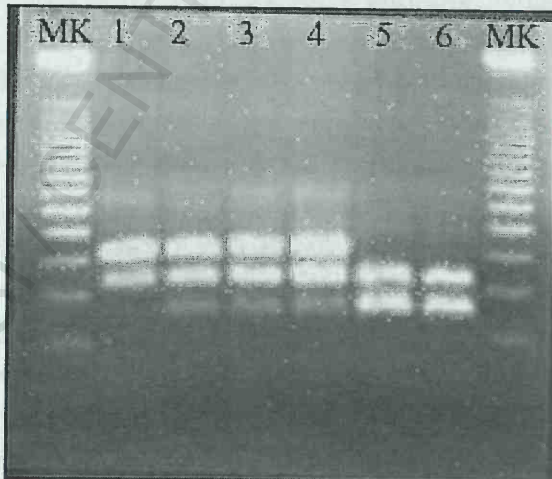


Figura 107. Electroforeză în gel de agaroză pentru evidențierea genotipurilor de la nivelul locusului β -lactoglobulinei. 1-genotip AA; 2-4-genotip AB; 5,6-genotip BB; MK - marker de masă moleculară 50 pb (Promega).

VI.4.4 Analiza moleculară a locilor asociați cu calitatea laptelui la ovine

Polimorfismul genetic al proteinelor din lapte prezintă un interes deosebit pe de-o parte datorită compoziției laptelui, iar pe de alta sub aspectul productivității. Conform FAO (*Food and Agriculture Organization*), din punct de vedere al producției, laptele ovinelor reprezintă 1,7 milioane de tone, adică aproximativ 22% din totalul producției mondiale de lapte. Principalii producători din Uniunea Europeană sunt Italia, Spania, Franța și Grecia.



Figura 108. Electroforeză în gel de agaroză pentru evidențierea genotipurilor de la nivelul locusului k-cazeinei. 1, 4 – genotip BB; 3 – genotip AB; 2, 5 – genotip AA; MK – marker de masă moleculară 50 pb (Promega).

Polimorfismul genetic observat la nivelul proteinelor din lapte reprezintă o consecință a mutațiilor care modifică secvența nucleotidică a diferitelor gene codificatoare, respectiv secvența de aminoacizi. Dezvoltarea tehnicilor de biologie moleculară a permis implementarea unor metode care pot identifica diferitele variante ale genelor care codifică pentru proteinele din lapte.

β -lactoglobulina este principala proteină din zerul ruminantelor. Dintre genele specifice care pot afecta diferite caracteristici economice la ovine, locusul β -lactoglobulinei a fost cel mai studiat. Astfel, gena β -lactoglobulinei a fost secvențializată (Ali et al., 1990), iar secvența codificatoare are o lungime de 486 pb și codifică pentru 162 de aminoacizi. Gena este alcătuită din 7 exoni și 6 introni. Proteina nativă se găsește sub forma unui dimer de 36,4 kDa. La pH 6,5 proteina

prezintă o structură globulară, compactă, iar la valori de pH mai mici sau mai mari ea tinde să disocieze în monomeri.

β -lactoglobulina prezintă un polimorfism crescut la majoritatea raselor de oi. Până în prezent au fost înregistrate trei variante genetice: β -lactoglobulina A, B și C. Varianta genetică A diferă de varianta genetică B în poziția 20, unde pentru varianta A există tirozină, iar pentru varianta B există histidină. Varianta C prezintă în poziția 148 substituția arginină trece în acid glutamic față de varianta A (Ali et al., 1990).

Diferitele studii realizate până acum relevă faptul că alela A este mai frecventă în populații decât alela B (Rampilli et al., 1997; Leone et al., 1998; Pietrola et al., 2000).

Polimorfismul genei β -lactoglobulinei a fost intens studiat la numeroase rase. Astfel, genotipurile AA și BB sunt corelate cu o calitate crescută a laptelui fie din punct de vedere al compoziției (conținut proteic și de grăsime), fie din punct de vedere al parametrilor tehnologici (timp de coagulare și fermitatea cheagului). Se consideră că în cazul genotipului AA conținutul de grăsimi și de materie uscată este mai mare. În cadrul procesului de obținere a brânzei, procentul de masă uscată pierdută este cel mai mic pentru genotipul AB, iar procentul de grăsime pierdută este mai mare pentru genotipul AA, comparativ cu genotipul BB (Rampilli et al., 1997).

Cazeinele formează un grup heterogen de fosfoproteine care precipită la o acidifiere a laptelui în jurul valorii de pH 4,6 și temperatură crescută. Cazeina influențează din punct de vedere cantitativ obținerea brânzeturilor. Cantitatea și tipul cazeinelor influențează producția și calitatea brânzei.

Studiile au demonstrat existența în cazul ovinelor a patru fracții denumite α_{s1} , α_{s2} , β - și κ -cazeina. Genele care codifică pentru aceste proteine se regăsesc la nivelul cromozomului 6 (Erhard et al., 1994). Polimorfismul ADN la nivelul celor patru loci și relația de linkage a acestora a fost pentru prima dată descrisă de Di Gregorio et al. și Leveziel et al. în 1991.

Cea mai uzuală metodă de diferențiere între genotipurile genelor codificatoare pentru β -lactoglobulină și α_{s1} -cazeină o reprezintă tehnica PCR-RFLP (Kevorkian et al., 2008a, b). Pentru a evalua distribuția alelelor genei codificatoare pentru β -lactoglobulină, produșii de amplificare au fost supuși digestiei cu enzima de restricție *Rsa I*. Polimorfismul care poate apărea (T trece în C) va modifica situsul de restricție al acestei enzime putându-se astfel deosebi exemplarele homozigote AA sau BB și cele heterozigote AB (Kevorkian et al., 2008a). În urma digestiei, pe gelul de electroforeză, se vor obține pentru alela A trei fragmente de 66, 37 și 17 pb, pentru alela B, două fragmente de 103 și 17 pb, iar în cazul animalelor heterozigote se vor obține toate cele patru fragmente (Figura 109).



Figura 109. Profilele de restricție corespunzătoare locusului β -lactoglobulinei. 1,2,3,5: genotip AB; 4,6: genotip AA; 7: fragment netăiat; 8: marker de masă moleculară 50 pb (Promega).

În cazul genei care codifică α_{s1} -cazeina pot fi desemnați primeri astfel încât să se amplifice un fragment de 372 pb de la nivelul exonului 3. Pentru a putea discrimina între indivizii care prezintă și cei care nu prezintă alela A pentru proteina α_{s1} -cazeina, produșii de amplificare au fost supuși digestiei cu enzima de restricție *Mbo* II (Kevorkian et al., 2008b). Polimorfismul care poate apărea va modifica situsul de restricție al acestei enzime putându-se astfel identifica exemplarele homozigote AA, homozigote nonAnonA și cele heterozigote nonA/A.

În urma digestiei, după electroforeză, pe gelul de agaroză se vor putea obține pentru indivizii homozigoți nonAnonA două fragmente de 306 și 66 pb, pentru indivizi homozigoți A/A trei fragmente de 160, 146 și 66 pb, iar în cazul animalelor heterozigote nonA/A se vor obține toate cele patru fragmente (Figura 110).

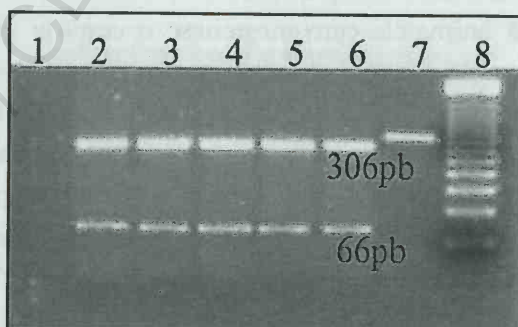


Figura 110. Profilele de restricție corespunzătoare locusului α_{s1} -cazeinei. 1: martor negativ; 2-6: genotip homozigot nonAnonA; 7: fragment netăiat; 8: marker de masă moleculară 50 pb (Promega).

VI.4.5 Analiza genelor asociate cu prolificitatea la ovine

Până în prezent, la rasele actuale de ovine, au fost descrise multe variații din punct de vedere al caracteristicilor fiziologice, inclusiv în ceea ce privește rata de ovulație și fecunditatea. Toate aceste variații apar deoarece ovinele au fost domesticate de câteva mii de ani, diferitele rase fiind selectate pentru caracteristici precum morfologia corpului, cantitatea de lapte, cantitate de lână etc. Astfel, între rase apar diferențe în ceea ce privește numărul de miei născuți per fătare. Studiile au arătat că rata de ovulație și numărul de produși per fătare pot fi reglate prin acțiunea mai multor gene cu efecte majore numite generic gene de fecunditate -*Fec*- (Davis, 2005).

Astfel, genele care codifică pentru proteinele BMP15 (*Bone Morphogenetic Protein 15*), GDF9 (*Growth Differentiation Factor 9b*) și BMP1B (*Bone Morphogenetic Protein Receptor 1B*) (Galloway et al., 2000; Mulsant et al., 2001; Souza et al., 2001; Hanrahan et al., 2004) sunt gene care fac parte din supefamilia TGFβ (*Transforming Growth Factor Beta*) și au fost corelate cu mutațiile care afectează rata de ovulație.

Booroola a fost prima genă majoră identificată care determină creșterea ratei de ovulație. Fenotipul hiperprolific al oilor *Booroola* a fost prima dată observat la rasa Merinos australian. Acest fenotip este datorat acțiunii unei singure gene autozomale (*FecB*) care influențează numărul de ovulații per ciclu estrogenic. În 2001, a fost determinată și mutația responsabilă de fenotipul hiperprolific al animalelor *Booroola* (Mulsant et al., 2001; Souza et al., 2001). Polimorfismul constă într-o mutație punctiformă la nivelul genei BMP1B. Modificarea G trece în A induce o substituție a glutaminei cu arginină. Posibilele alele sunt: *FecB^B*, corelată cu o rată foarte mare a prolificității, și *FecB⁺*, întâlnită la tipul sălbatic (Mulsant et al., 2001; Souza et al., 2001). S-a observat că animalele care moștenesc o copie a genei *Booroola* produc aproximativ 1,5 extra ovule și dau naștere cu aproximativ 1 miel mai mult per fătare. Originea mutației *Booroola* este reprezentată de rasa Garole din India, ulterior aceasta fiind identificată și la alte rase de ovine (Davis et al., 2006; Kumar et al., 2006).

Mutații ale altor gene majore care afectează rata de ovulație, *Inverdale* și *Hanna*, au fost identificate de către Galloway et al. în anul 2000. Din punct de vedere genetic mutația *Inverdale* (*FecX^I*) se caracterizează printr-o modificare T trece în A în poziția 896 a ADNc de la nivelul genei care codifică pentru BMP15. Această modificare determină substituția valinei cu acidul aspartic în poziția 299 a proteinei.

Galloway și colaboratorii (2000) au descris și mutația *Hanna* (*FecX^H*) care prezintă același model de transmitere și fenotip cu mutația *Inverdale*. Genetic, această

mutație se caracterizează prin modificarea C trece în T în poziția 871 a ADNc la nivelul BMP15. Mutația *Hanna* determină apariția unui codon STOP prematur la nivelul aminoacidului din poziția 291, ceea ce determină pierderea activității proteinei BMP 15.

În 2004, Hanrahan și colaboratorii au determinat la rasele de ovine Belclare și Cambridge, două noi mutații la nivelul genei BMP 15. Acestea au fost denumite *FecX^G* (*Galway*) și *FecX^B* (*Belclare*), iar polimorfismele se caracterizează prin substituții de tipul C→T și G→T la nivelul nucleotidelor 718 și respectiv 1100. Mutația *FecX^G* determină apariția unui codon STOP în regiunea care codifică aminoacidul 239, iar în cazul mutației *FecX^B* serina este substituită cu izoleucina la nivelul aminoacidului 367.

Este astfel evident că, pe baza identificării genotipurilor prezente la nivelul acestor loci, se pot derula programe de selecție pentru a crește nivelul de prolificitate al raselor de ovine. Pentru evaluarea distribuției alelelor genei *FecB*, produșii specifici de amplificare PCR sunt supuși digestiei cu enzima de restricție *Ava II*. Polimorfismul care poate apărea va modifica situsul de restricție al acestei enzime putându-se astfel diferenția între animalele purtătoare și cele nepurtătoare (Georgescu et al., 2011a). În urma digestiei, pe gelul de agaroză se vor obține, în cazul animalelor purtătoare două fragmente de 160 și 30 pb, iar în cazul animalelor nepurtătoare fragmentul de 190 pb va rămâne intact.

În Figura 111 este reprezentat profilul electroforetic obținut prin tehnica PCR-RFLP în vederea diferențierii diferitelor alele ale genei *FecB*. În urma digestiei cu enzima de restricție *Ava II* s-au obținut doar exemplare nepurtătoare ale genei *FecB⁺* (tipul sălbatic).



Figura 111. PCR-RFLP pentru analiza locusului *FecB*. 1-7: genotip sălbatic; 8: marker de masă moleculară 50 pb (Promega).

Existența unui polimorfism la nivelul genei *FecB* determină apariția atât a unor efecte pozitive, cât și a unora negative. Efectul pozitiv al genei *FecB* îl reprezintă creșterea numărului de animale născute per fătare, în timp ce efectele negative sunt observate la nivelul greutateii corporale și a dezvoltării în timpul sarcinii. Greutățile corporale în timpul gestației sunt mai mici la homozigoții purtători sau la heterozigoți, comparativ cu homozigoții nepurtători, și totodată aceștia cresc mai greu (Guan et al., 2007).

Pentru evaluarea prezenței mutației *FecXI*, produșii de amplificare au fost supuși digestiei cu endonucleaza de restricție *Xba I*. Polimorfismul care poate apărea va modifica situsul de restricție al acestei enzime putându-se astfel diferenția între diferitele alele (Georgescu et al., 2011b). În urma digestiei, pe gelul de agaroză se vor obține în cazul animalelor purtătoare două fragmente, iar în cazul animalelor normale un singur fragment de 154 pb. În Figura 112 este reprezentată electroforeza în gel de agaroză pentru produșii de restricție obținuți la indivizii analizați. În urma digestiei cu enzima de restricție *Xba I* s-au obținut doar exemplare având genotipul sălbatic la nivelul acestui locus.

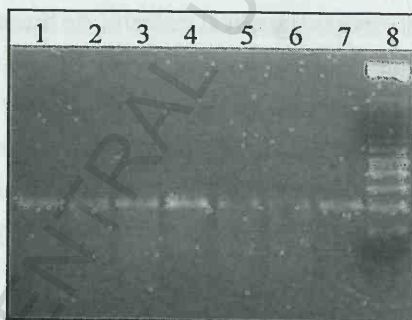


Figura 112. PCR-RFLP pentru evidențierea mutației *FecXI*. 1-7: genotip sălbatic; 8: marker de masă moleculară 50 pb (Promega).

VI.5 Filogenie și filogeografie

VI.5.1 Analiza relațiilor filogenetice în cadrul ordinului *Acipenseriformes*

Relațiile filogenetice în cadrul ordinului *Acipenseriformes* (care cuprinde sturionii și peștii lopătari) nu sunt pe deplin elucidate, iar unele clasificări ale speciilor au rămas și la ora actuală controversate. O serie de rezultate ale clasificărilor anterioare pe baza caracterelor morfometrice au fost puse sub semnul întrebării de

rezultatele obținute pe baza analizei filogenetice moleculare. În funcție de markerii filogenetici utilizați, diferite studii au ajuns la contradicții în ceea ce privește anumite aspecte legate de filogenia sturionilor, cum ar fi, de exemplu, monofilia genului *Huso* sau poziția ocupată de anumite specii de sturioni din America de Nord.

Pentru stabilirea relațiilor filogenetice au fost selectați ca markeri genele mitocondriale pentru citocrom b, citocrom c oxidază I și citocrom c oxidază II. Aceștia sunt markeri cu evoluție moderată, prin comparație cu genele pentru ARNr16S și ARNr12S care sunt considerate secvențe cu evoluție lentă și sunt considerate potrivite pentru o caracterizare taxonomică de nivel superior sau cu regiunea de control mitocondrială (*D-Loop*) care evoluează foarte rapid și este utilă pentru stabilirea relațiilor existente între specii apropiate sau între populații aparținând aceleiași specii.

Analiza filogenetică a fost realizată utilizând secvențe de ADN mitocondrial (ADNmt) cu lungimea de 2486 pb, rezultate prin concatenarea secvenței integrale a genei pentru citocrom b (1141 pb) și a secvențelor parțiale de 678 pb pentru gena *coxI* și, respectiv, 667 pb pentru gena *coxII*.

În scopul determinării relațiilor filogenetice, pe lângă secvențele obținute pentru cele patru specii de sturioni din Dunărea Inferioară (*Acipenser stellatus*, *Acipenser ruthenus*, *Acipenser gueldenstaedtii* și *Huso huso*) au fost selectate și 26 de secvențe din GenBank Database (Tabel 14), în studiu fiind luate 25 de specii aparținând ordinului *Acipenseriformes*, iar ca *outgroup* fiind selectată specia *Polypterus ornatipinnis* (reprezentant al celui mai înrudit taxon cu sturionii – ordinul *Polypteriformes*).

Tabel 14. Secvențele din baza de date utilizate în studiul relațiilor filogenetice la speciile de sturioni.

Nr. crt.	Specie	Număr de acces		
		<i>cyt b</i>	<i>coxI</i>	<i>coxII</i>
1.	<i>Polyodon spathula</i>	AP004353	AP004353	AF125652
2.	<i>Psephurus gladius</i>	NC_005834	NC_005834	NC_005834
3.	<i>Scaphirhynchus albus</i>	U56987	KF930372	AF125660
4.	<i>Scaphirhynchus platorhynchus</i>	U55985	JN028406	AF125659
5.	<i>Scaphirhynchus suttkusi</i>	U55994	AF404848	AF125661
6.	<i>Huso huso</i> (Marea Caspică)	AJ245840	FJ809718	AY547420
7.	<i>Acipenser fulvescens</i>	AJ245829	EU523878	AF125653
8.	<i>Acipenser brevirostrum</i>	AJ245828	EU523876	AF125654
9.	<i>Acipenser baerii</i>	AJ245825	GQ328814	AY547409
10.	<i>Acipenser gueldenstaedtii</i> (Marea Caspică)	AJ563396	FJ392605	AY547410
11.	<i>Acipenser persicus</i>	AJ245837	FJ809720	AY547414
12.	<i>Acipenser naccarii</i>	AJ245834	KJ552707	AY547412

13.	<i>Acipenser nudiventris</i>	AJ245832	KC500117	AY547413
14.	<i>Acipenser stellatus</i> (Marea Caspică)	AJ585050	AJ585050	AY547417
15.	<i>Pseudoscaphirhynchus kaufmanni</i>	DQ195872	DQ202325	DQ202326
16.	<i>Acipenser transmontanus</i>	NC_004743	KF558304	AF125655
17.	<i>Acipenser schrenckii</i>	AJ251451	KP218534	AY547416
18.	<i>Acipenser sinensis</i>	AJ251186	KP218555	AY547419
19.	<i>Acipenser dabryanus</i>	AJ510085	AJ510085	AJ510085
20.	<i>Huso dauricus</i>	AJ253187	GQ502677	AY547421
21.	<i>Acipenser medirostris</i>	AJ245830	KF558288	AF125656
22.	<i>Acipenser mikadoi</i>	AJ245831	AJ245831	AY547411
23.	<i>Acipenser oxyrinchus</i>	AJ245838	KM286426	AF125657
24.	<i>Acipenser sturio</i>	AJ245839	GQ502673	AY547418
25.	<i>Acipenser ruthenus</i> (râul Tisa)	AJ249694	-	AY547415
26.	<i>Polypterus ornatipinnis</i>	NC_001778	NC_001778	NC_001778

După alinierea tuturor secvențelor (excluzând specia *outgroup*) pentru gena mitocondrială *cytb*, s-a constatat că dintre cele 1141 de situsuri nucleotidice 339 (29,7%) reprezintă situsuri variabile și 279 (24,45%) situsuri informative din punct de vedere parcimonial. În ceea ce privește secvența *coxI*, dintre cele 678 situsuri nucleotidice analizate 210 (30,97%) sunt variabile, iar 149 (21,97%) sunt informative din punct de vedere parcimonial. În cazul *coxII* dintre cele 667 de situsuri analizate, 159 (23,84%) sunt variabile și 119 (17,84%) sunt informative din punct de vedere parcimonial. Pentru cele trei secvențe mitocondriale concatenate însumând în total 2486 pb, s-au identificat 708 (28,47%) situsuri variabile, dintre care 547 (22%) sunt informative din punct de vedere parcimonial (Tabel 15). Genele pentru *citocrom b* și *citocrom C oxidază I* prezintă un grad de variabilitate similar, în timp ce gena pentru *citocrom C oxidază II* este mai conservată.

Tabel 15. Variația și conținutul de informație parcimonială a secvențelor analizate.

Gena	Număr total de situsuri	Număr de situsuri variabile (%)	Număr de situsuri parcimonice (%)
<i>cytb</i>	1141	339 (29,7)	279 (24,45)
<i>coxI</i>	678	210 (30,97)	149 (21,97)
<i>coxII</i>	667	159 (23,84)	119 (17,84)
<i>cytb+ coxI+ coxII</i>	2486	708 (28,47%)	547 (22%)

Estimarea relațiilor filogenetice pornind de la informația conținută în secvențele ADN se bazează pe definirea acelei succesiuni de etape (algoritmi) prin care se poate construi cel mai bun arbore filogenetic. Un arbore filogenetic constituie reprezentarea grafică a filogeniei unui grup de organisme. Pentru obținerea arborilor filogenetici se respectă următoarea succesiune de etape:

- i. obținerea, compararea și alinierea secvențelor obținute cu cele din băncile de date.
 - ii. selectarea metodelor filogenetice.
 - iii. construirea arborilor și evaluarea acestora.
- i. Alinierea secvențelor

Baza fundamentală a unui arbore filogenetic este realizarea unui aliniament multiplu conținând secvențele de interes. Prin alinierea secvențelor se confirmă că acestea sunt omoloage. În cazul studiului nostru, secvențele obținute pentru speciile de sturioni din Dunărea Inferioară au fost vizualizate și prelucrate utilizând programul BioEdit (Hall, 1999), iar apoi alinate cu secvențe similare aparținând altor specii din ordinal Acipenseriformes și descărcate din GenBank Database, utilizând programul Clustal X (Larkin et al., 2007). Clustal X reprezintă interfața grafică pentru Windows a Clustal W, program care realizează alinieri multiple de secvențe.

- ii. Alegerea metodelor de construcție a arborilor

În general se utilizează două categorii de metode pentru construirea arborilor filogenetici:

- metode de distanță (fenetice);
- metode de caractere (cladistice).

Metodele de distanță propun construirea arborilor plecând de la asemănările observate între fiecare pereche de unități evolutive și se bazează pe calculul unei matrice de distanță obținută comparând secvențele două câte două și calculând numărul total de diferențe pentru toate cuplurile posibile. Se construiește apoi un arbore filogenetic ale cărui ramuri sunt cât mai apropiate de numerele conținute de matricea de distanță. Cea mai utilizată metodă de distanță este *Neighbor Joining* (NJ).

Metodele de caractere includ printre altele metoda *Maximum Parsimony* (MP) care este o tehnică cladistică bazată pe parcimonie. Principiul parcimoniei postulează că pentru un grup de specii, filogenia verosimilă este cea care necesită cel mai mic număr de schimbări evolutive. Etapele de analiză prin metoda MP sunt următoarele:

- i. identificarea situsurilor informative din punct de vedere parcimonic;
- ii. deducerea tuturor topologiilor arborilor posibili pentru secvențele de date;
- iii. calculul numărului minim de substituții pentru fiecare situs informativ;
- iv. calculul sumei de modificări pentru fiecare arbore;
- v. alegerea topologiei arborelui care necesită cele mai puține modificări.

Metoda MP deduce arborele cu cel mai mic număr de pași necesari pentru a produce variații ale secvenței observate. MP prezintă o serie de avantaje: ține cont de tipurile de caractere, nu reduce informația la un număr unic, încearcă să furnizeze informație despre secvențele ancestrale și evaluează arbori diferiți. Comparativ cu

metodele de distanță este foarte lentă. De asemenea, prezintă dezavantajul de a nu utiliza decât parțial informația (situri informative), nu corectează substituțiile multiple și nu calculează lungimea brațelor.

Metoda *Maximum Likelihood* (ML) este o alternativă la metoda MP. Aceasta este o metodă statistică utilizată pentru a deduce parametrii distribuției de probabilitate a unui anumit eșantion. Din moment ce fiecare situs evoluează independent, arborele este calculat separat pentru fiecare dintre acestea. Probabilitatea maximă este calculată pentru probabilitatea fiecărui nucleotid dintr-un aliniament, pe baza unui model al procesului de substituție. Prin metoda ML se încearcă reconstruirea unei filogenii folosind un model explicit de evoluție. Metoda este mai eficientă când este folosită pentru a testa sau a optimiza un arbore deja existent.

ML prezintă o serie de avantaje: conduce la rezultatul cel mai apropiat de arborele evolutiv real, comparativ cu parcimonia este mai consistentă și mai puțin sensibilă la efectele atracției brațelor lungi și permite aplicarea diferitelor modele și estimarea lungimii brațelor în funcție de schimbarea evolutivă. Principalul dezavantaj este acela că necesită o mare putere de calcul și mult timp, fiind cea mai lentă dintre toate metodele filogenetice.

Cu ajutorul programului ModelTest (Posada și Crandall, 1998) au fost stabilite modelele evolutive pentru secvențele analizate. Pentru secvențele mitocondriale reunite, modelul evolutiv selectat a fost Tamura-Nei Plus Gamma. Pentru a verifica consistența rezultatelor analizei filogenetice, au fost construiți arbori filogenetici prin trei metode diferite: *Neighbor-Joining*, *Maximum-Parsimony* și *Maximum Likelihood*. Utilizând algoritmul corespunzător modelului evolutiv determinat anterior au fost calculate distanțele genetice precum și deviațiile lor standard. Pe baza acestora s-au construit arbori filogenetici prin metoda NJ implementată în programul MEGA4 (Tamura et al., 2007).

Arborii filogenetici prin metoda MP au fost construiți cu ajutorul aplicației DnaPars implementată în pachetul de programe PHYLIP 3.68 (PHYLogeny Inference Package) (Felsenstein et al., 1989), iar cei prin metoda ML au fost construiți utilizând programul PhyML (Guindon et al., 2003). Fiabilitatea arborilor a fost testată prin metoda *Bootstrap* cu 1000 de replicare, iar arborii consens rezultați au fost vizualizați cu programul TreeView (Page, 1996).

Arborii construiți pe baza secvențelor mitocondriale concatenate prin metode diferite au prezentat topologii similare, evidențiind aceleași grupuri monofiletice (Figurile 113-115).

Este evidențiată o separare în cadrul ordinului *Acipenseriformes* a două clade monofiletice: *Polyodontidae* (reprezentată de *Polyodon spathula* și *Psephurus gladius*) și

Acipenseridae. Cele două specii de pești lopătari (*Polyodontidae*) formează o cladă monofiletică separată de *Acipenseridae*.

Sturionul american de Atlantic (*Acipenser oxyrinchus*) și sturionul european de Atlantic (*Acipenser sturio*) formează o cladă separată și ocupă o poziție bazală în cadrul *Acipenseridelor*. Poziția bazală este împărțită în funcție de tipul de algoritm utilizat pentru construcția arborilor cu speciile genului *Scaphirhynchus*. Astfel, clusterul *Acipenser oxyrinchus*/*Acipenser sturio* este bazal în arborii construiți prin NJ și prin ML cu un suport foarte bun (valori de bootstrap 99-100%). Analiza de tip MP plasează grupul format din speciile genului *Scaphirhynchus* bazal față de speciile genurilor *Acipenser* și *Huso*, în concordanță cu clasificarea filogenetică bazată pe date morfometrice (Birstein și DeSalle, 1998).

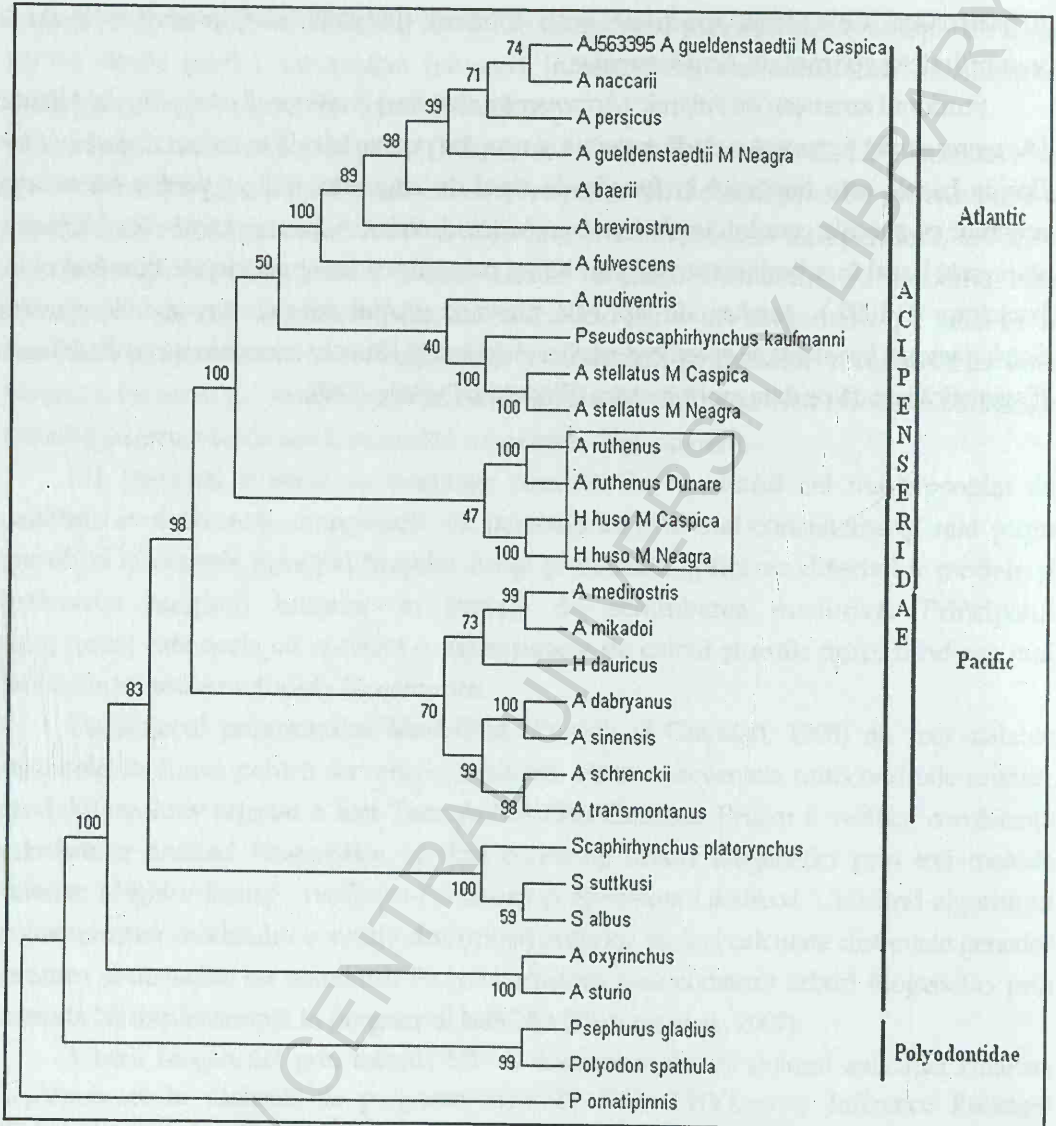


Figura 113. Arbore filogenetic construit prin metoda NJ.

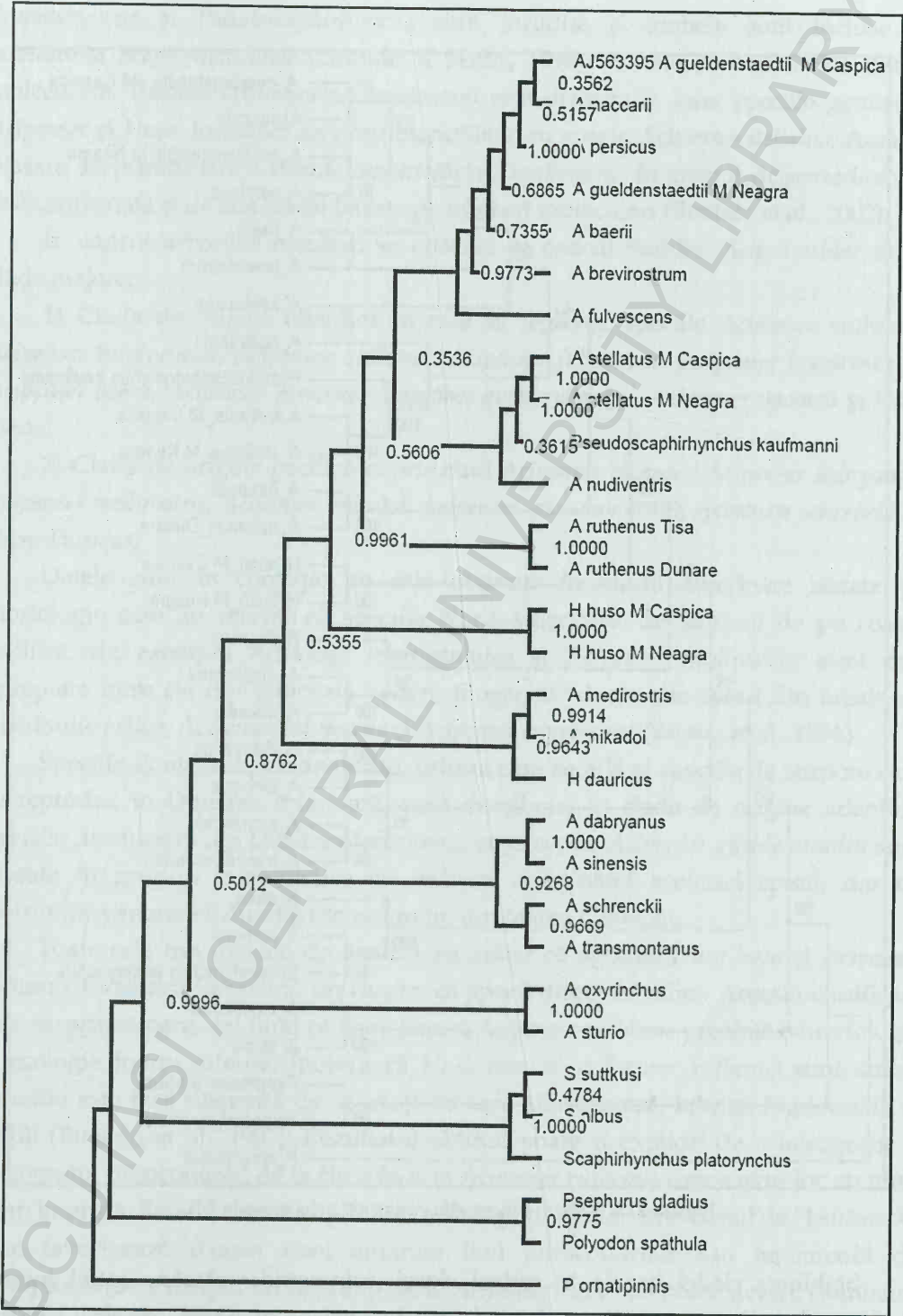


Figura 114. Arbore filogenetic construit prin metoda MP.

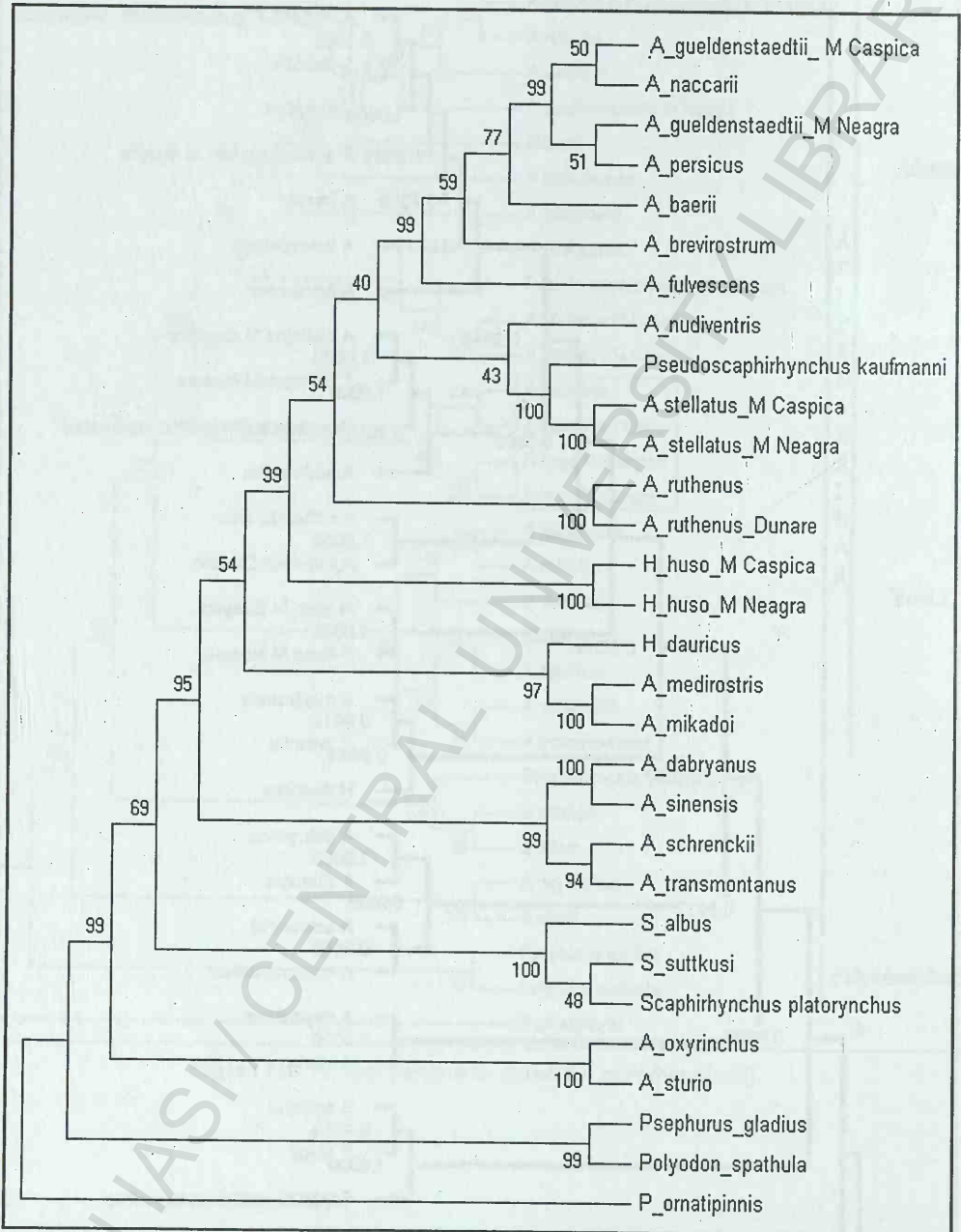


Figura 115. Arbore filogenetic construit prin metoda ML.

Stabilirea cladei bazale în cadrul clasei *Acipenseridae* rămâne astfel incertă. Ipoteza bazată pe analiza datelor morfometrice conform căreia genurile

Scaphirhynchus și *Pseudoscaphirhynchus* sunt înrudite și ambele sunt incluse în subfamilia *Scaphirhynchinae* (Grande și Bemis, 1996) nu este confirmată de datele moleculare. *Pseudoscaphirhynchus kaufmanni* este distribuită între speciile genurilor *Acipenser* și *Huso*, formând un grup monofiletic cu specia *Acipenser stellatus*. Această plasare surprinzătoare a *Pseudoscaphirhynchus kaufmanni* în grupul *Acipenserinelor* a fost confirmată și de alte studii bazate pe markeri moleculari (Birstein et al., 2002).

În cadrul arborilor rezultați se observă în cadrul familiei *Acipenseridae* două clade majore:

1) Clada de origine atlantică în care se regăsesc speciile *Acipenser ruthenus*, *Acipenser nudiventris*, *Acipenser stellatus*, *Acipenser fulvescens*, *Acipenser brevirostrum*, *Acipenser baerii*, *Acipenser persicus*, *Acipenser gueldenstaedtii*, *Acipenser naccarii* și *Huso huso*.

2) Clada de origine pacifică cuprinzând *Acipenser sinensis*, *Acipenser dabryanus*, *Acipenser medirostris*, *Acipenser mikadoi*, *Acipenser transmontanus*, *Acipenser schrenckii* și *Huso dauricus*.

Datele sunt în corelație cu cele obținute în studii anterioare bazate pe morfologie care au relevat că speciile Nord-Americane de sturioni de pe coasta pacifică, de exemplu *Acipenser transmontatus* și *Acipenser medirostris*, sunt mai apropiate între ele din punct de vedere filogenetic decât alte specii din areale de distribuție estice, *Acipenser fulvescens* și *Acipenser oxyrinchus* (Brown et al., 1996).

Speciile Ponto-Caspice analizate, printre care se află și speciile de sturioni care se reproduc în Dunărea Inferioară, sunt distribuite în clada de origine atlantică. Speciile de sturioni din Dunărea Inferioară, cu excepția *Acipenser gueldenstaedtii* sunt plasate în grupuri monofiletice cu indivizi aparținând aceleiași specii, dar cu distribuție geografică diferită (de exemplu, din Marea Caspică).

Toate cele trei metode de analiză au arătat că speciile *Huso huso* și *Acipenser ruthenus* formează împreună un cluster, ca specii direct înrudite. Această clasificare este surprinzătoare, dat fiind că *Huso huso* și *Acipenser ruthenus* prezintă o morfologie și ecologie foarte diferite. Ipoteza că *Huso huso* și *Acipenser ruthenus* sunt strâns înrudite este însă susținută de ușurința cu care hibridizează, hibrizii fiind viabili și fertili (Birstein et al., 1997). Rezultatul obținut poate fi explicat de o introgresie a genomului mitocondrial de la *Huso huso* la *Acipenser ruthenus* care a avut loc cu mult timp în urmă. Relativ recent a apărut în cadrul populațiilor fenomenul de "bottleneck" care favorizează fixarea unei anumite linii mitocondriale sau fenomenul de introgresie (de exemplu un haplotip de la *Acipenser ruthenus* poate deveni dominant la *Huso huso* sau invers). În această situație, înrudirea între *Huso huso* și *Acipenser*

ruthenus este mai degrabă artificială și rezultă din istoria genelor și nu neapărat din istoria speciilor. Rezultate similare care plasează morunul și cega într-un grup monofiletic au fost obținute de Birstein și DeSalle (1998) și Krieger et al. (2008).

Cele două specii ale genului *Huso* sunt distribuite între speciile genului *Acipenser*, ceea ce înseamnă că genul *Huso* nu este monofiletic și nu formează o unitate taxonomică separată. Această idee este destul de veche, fiind formulată chiar ipoteza că cele două specii, *Huso huso* și *Huso dauricus* nu aparțin de fapt aceluiași gen. În ciuda diferențelor morfologice între cele două specii de *Huso* și speciile genului *Acipenser* validitatea genului este încă discutabilă (Sokolov, 1989). *Huso dauricus* ocupă o poziție bazală în cadrul grupului monofiletic pe care îl formează *Huso huso* și *Acipenser ruthenus*.

Acipenser stellatus formează un grup monofiletic cu *Pseudoscaphiyrhincus kaufmanni*, iar *Acipenser gueldenstaedtii* cu speciile euroasiatice *Acipenser baerii*, *Acipenser persicus* și *Acipenser naccarii*. Secvențele provenind de la *Acipenser gueldenstaedtii* din Marea Neagră și Marea Caspică nu sunt plasate într-un cluster monofiletic în cadrul cladei atlantice. Acest fapt nu este deloc surprinzător, dat fiind faptul că s-a demonstrat caracterul polifiletic al liniilor mitocondriale pentru indivizii de *Acipenser gueldenstaedtii* din Marea Caspică. Un studiu anterior a dovedit, în urma analizei filogenetice bazată pe markeri mitocondriali, că una dintre liniile mitocondriale obținute la această specie din Marea Caspică este plasată într-o cladă împreună cu *Acipenser persicus* și *Acipenser naccarii*, în timp ce alta este mai apropiată de *Acipenser baerii* (Birstein et al., 2002).

Putem concluziona că analiza filogenetică prin trei metode diferite a datelor mitocondriale a relevat existența celor două clade, atlantică și pacifică, speciile de sturioni din Marea Neagră care migrează în scop reproductiv în Dunărea Inferioară fiind distribuite în cadrul cladei de origine atlantică. În perspectivă, pentru rezolvarea controverselor referitoare la relațiile filogenetice din cadrul ordinului *Acipenseriformes*, este necesară analiza unor markeri filogenetici cu localizare la nivelul genomului nuclear, dar și o abordare de tip mitogenomic, care presupune analiza întregului genom mitocondrial.

VI.5.2 Analiza filogeografică a speciilor de sturioni din regiunea Ponto-Caspică

În cazul speciilor aflate în nevoie de conservare, succesul programelor desfășurate în acest sens depinde de recunoașterea și managerierea corectă a

unităților genetice semnificative pentru conservare. Aceasta presupune identificarea unor grupuri distincte din punct de vedere genetic, preferabil cu o diversitate genetică însemnată și cu o istorie evolutivă unică, numite și unități semnificative din punct de vedere evolutiv (*Evolutionary Significant Units* – ESU) (Blair et al., 2013).

În sens larg, ESU sunt definite ca subspecii, populații sau grupuri de populații distincte din punct de vedere genetic și ecologic (Allendorf și Luikart, 2007) și caracterizate prin izolare reproductivă și adaptare la anumit teritoriu, monofilie reciprocă la nivelul locilor mitocondriali, lipsa “interschimbabilității ecologice” (morfologie diferită, variație la nivelul locilor QTL, habitat diferit etc.) și a “interschimbabilității genetice” (lipsa unui flux de gene recent, concordanță între relațiile filogenetice și distribuția geografică) (Crandall et al., 2000).

În contextul derulării unor programe care își propun salvarea speciilor de sturioni din regiunea Ponto-Caspică este important să se stabilească care sunt unitățile semnificative pentru conservare în cazul celor trei specii anadrome de sturioni din această regiune (*Huso huso*, *Acipenser stellatus* și *Acipenser gueldenstaedtii*) și de a clarifica relațiile de diferențiere genetică în cadrul speciilor.

În trecut, în regiunea Ponto-Caspică, formată din bazinele Mării Negre, Caspice și Azov, erau întâlnite numeroase specii de sturioni, dar la ora actuală numai șase dintre acestea mai sunt prezente în zona respectivă. Marea Neagră și Marea Azov comunică prin strâmtoarea Kerçi, în timp ce Marea Caspică este complet separată de celelalte două bazine. Principalele fluvii din regiune sunt Volga și Ural, care se varsă în Marea Caspică, Dunărea, Niprul și Nistrul, care se varsă în Marea Neagră și Donul și Kubanul, care se varsă în Marea Azov. Acestea împreună cu afluenții lor oferă situsuri propice pentru reproducerea speciilor anadrome de sturioni din cele trei mări.

Luând în considerare anumite caracteristici morfologice și reproductive, s-a realizat o clasificare a speciilor Ponto-Caspice de sturioni în subspecii, corespunzător distribuției lor geografice. Pentru specia *Acipenser stellatus* a fost propusă următoarea încadrare taxonomică în subspecii: *Acipenser stellatus stellatus* caracteristică Mării Caspice, *Acipenser stellatus ponticus* cu distribuție în Marea Neagră și *Acipenser stellatus donensis* întâlnită în Marea Azov. Similar, în cazul speciei *Huso huso* a fost propusă o încadrare în subspecii în conformitate cu bazinul în care sunt întâlnite. Astfel, subspecia *Huso huso ponticus* corespunde bazinului Mării Negre, *Huso huso caspicus* este întâlnită în Marea Caspică, iar *Huso huso maeoticus* în Marea Azov (Pirogovskii et al., 1989). În cazul *Acipenser gueldenstaedtii*, o singură subspecie

corespunde Mării Negre și Mării Azov (*Acipenser gueldenstaedtii colchicus*) și una Mării Caspice (*Acipenser gueldenstaedtii gueldenstaedtii*) (Vlasenko et al., 1989).

Deși această încadrare taxonomică nu este unanim acceptată, se poate dovedi utilă în special în cazul adoptării unor programe de conservare a acestor specii periclitate, care presupun identificarea și gestionarea unităților care există în cadrul speciilor. Datele genetice pot fi de un real ajutor pentru a confirma separarea în unități distincte, fie ele subspecii sau populații alopatrice. O astfel de abordare a fost propusă în cazul speciilor de sturioni din America de Nord pentru care sunt derulate programe de conservare. Astfel, pentru populațiile de sturion de lac (*Acipenser fulvescens*) din regiunea Marilor Lacuri a fost realizată identificarea cu ajutorul markerilor moleculari a unităților genetice pentru repopulare (GSU - *Genetic Stocking Units*).

Similar, unităților semnificative din punct de vedere evolutiv, o unitate GSU reprezintă o populație sau un grup de populații care poate fi folosit ca sursă de indivizi adulți pentru reproducerea asistată a acestora în condiții acvacultură și repopularea cu puietul rezultat a zonei/zonelor respective. Datele obținute în urma genotipării indivizilor aparținând unui număr de 30 de populații au fost analizate cu programe specializate și au permis identificarea a șase unități genetice pentru conservare (Walsh, 2000).

Pentru a testa ipoteza existenței subspeciilor cu ajutorul markerilor ADN am secvențializat și analizat secvențele obținute pentru regiunea mitocondrială de control (*D-loop*). Aceasta reprezintă o regiune necodantă de la nivelul genomului mitocondrial implicată în inițierea replicării ADN pe catena H (Saccone et al., 1991). În cazul sturionilor, regiunea *D-loop* este variabilă ca lungime la specii diferite, dar și în cadrul aceleiași specii datorită apariției fenomenului de heteroplasmie (Ludwig et al., 2000). Luând în considerare distribuția segmentelor variabile în diferite părți ale regiunii de control, aceasta a fost împărțită în trei domenii:

- i. domeniul TAS (*Termination Associated Sequence*);
- ii. domeniul CCS (*Central Conserved Sequence*)
- iii. domeniul CBS (*Conserved Block Sequences*).

Majoritatea variațiilor nucleotodice (substituții, deleții, inserții) sunt întâlnite în domeniile TAS și CBS, în timp ce domeniul CCS este mai conservat. S-a constatat că regiunea repetitivă responsabilă de variațiile de lungime și apariția heteroplasmiei este localizată la capătul 5' al regiunii *D-loop* și este separată prin câteva nucleotide de gena care codifică pentru ARN_t^{Pro}.

Deoarece mutațiile se acumulează mai rapid la nivelul regiunii de control comparativ cu alte segmente mitocondriale, aceasta reprezintă un marker foarte bun pentru studii la nivel intraspecific/populațional.

Pentru investigarea relațiilor genetice intraspecifice în cazul celor trei specii anadrome de sturioni din regiunea Ponto-Caspică (*Huso huso* – morun, *Acipenser stellatus* – păstrugă și *Acipenser gueldenstaedtii* – nisetru), a fost analizată regiunea de control în cazul unui număr de 78 indivizi (28 de nisetru, 27 de păstrugă și 23 de morun) capturați în Dunărea Inferioară în perioada 2008-2011, provenind din metapopulația din Marea Neagră.

Regiunea mitocondrială de control a fost amplificată utilizând o pereche de primeri care prezintă complementaritate de secvență cu regiunile flancatoare corespunzătoare genelor ARN_t^{Pro} și ARN_t^{Phe} . Secvențele obținute au fost verificate și prelucrate utilizând programul BioEdit (Hall, 1999), iar apoi aliniate cu programul Clustal X 2.0.9 (Larkin et al., 2007). În scopul analizei filogeografice, secvențele au fost aliniate și comparate cu secvențe similare din baza de date GenBank, provenind de la indivizi aparținând aceluiași specii, dar cu origine geografică diferită. Pentru a evita eventualele erori în interpretarea datelor, secvențele au fost trunchiate și din analiză a fost exclusă regiunea hipervariabilă din structura *D-loop*.

Diversitatea genetică a fost evaluată prin calcularea numărului de haplotipuri, a diversității haplotipice (H_d) și a diversității nucleotidice (P_i) utilizând programul DnaSP v5.1 (Librado și Rozas, 2009). Diferențierea genetică între populații evaluată pe baza indicelui Wright de fixare (F_{st}), dar și ai altor indici statistici de diferențiere (Γ_{MST} , H_s , K_s) a fost analizată utilizând același program, iar semnificația statistică a fost testată prin folosirea permutărilor cu 10.000 de replicare. Numărul de migranți (N_m) a fost calculat pentru a estima fluxul de gene între populații, iar pentru identificarea nucleotidelor fixe, cu caracter de diagnostic a fost aplicată o analiză de tip PAA (*Population Aggregation Analysis*) (Davis și Nixon, 1992). Pentru vizualizarea relațiilor existente între populațiile investigate a fost construită o rețea haplotipică utilizând algoritmul MJ (*Median-Joining*) implementat în programul NETWORK v4.6.1 (Bandelt et al., 1999).

Analiza variației genetice intraspecifice

În cazul probelor investigate, a fost identificat un număr de patru haplotipuri pentru populația de nisetru, respectiv un număr de șapte haplotipuri pentru populațiile de păstrugă și morun din Marea Neagră care se reproduc în Dunărea Inferioară.

Pentru a testa din punct de vedere genetic ipoteza existenței subspeciilor și în scopul identificării unităților genetice utile în conservare, secvențele obținute, reprezentând haplotipuri distincte, au fost aliniate și comparate cu secvențe similare din GenBank

provenind de la indivizi din Marea Neagră, Marea Caspică și Marea Azov. Aliniamentele de secvențe au cuprins 32 de secvențe pentru nisetru, 78 pentru păstrugă și 43 pentru morun. Datorită numărului redus de secvențe introduse în GenBank pentru subspecia *Huso huso maeoticus* caracteristică Mării Azov, aceasta a fost exclusă din analizele ulterioare, cu excepția construirii rețelei de haplotipuri pentru morun. În cazul setului de date provenind de la indivizi cu origine geografică diferită au fost identificate 23 de haplotipuri pentru nisetru, 65 de haplotipuri pentru păstrugă și 30 de haplotipuri pentru morun.

Pentru subspeciile investigate au fost calculați indicii de diversitate haplotipică, de tipul diversității haplotipice, nucleotidice și al numărului de situsuri polimorfice prin care se estimează gradul de polimorfism de la nivelul secvențelor de ADN și, în acest mod, gradul de variație genetică intraspecifică (Tabel 16).

Tabel 16. Indici de diversitate haplotipică calculați la *Acipenser gueldenstaedtii*, *Acipenser stellatus* și *Huso huso* (Dudu et al., 2014).

Subspecia	Origine	n	H	H _d	(P _i)	Situsuri variabile	Situsuri parcimonice	Situsuri singleton
<i>Acipenser gueldenstaedtii colchicus</i>	Marea Azov	4	3	0,84762	0,02854	134	93	41
<i>Acipenser gueldenstaedtii colchicus</i>	Marea Neagră	15	9	0,83333	0,03633			
<i>Acipenser gueldenstaedtii colchicus</i>	Mările Azov și Caspică	19	12	0,9006	0,03527			
<i>Acipenser gueldenstaedtii gueldenstaedtii</i>	Marea Caspică	13	11	0,97436	0,05005			
<i>Acipenser gueldenstaedtii</i>		32	23	0,9617	0,04494			
<i>Acipenser stellatus donensis</i>	Marea Azov	34	28	0,98396	0,01352	108	76	32
<i>Acipenser stellatus ponticus</i>	Marea Neagră	38	34	0,99341	0,01864			
<i>Acipenser stellatus stellatus</i>	Marea Caspică	6	5	0,93333	0,01937			
<i>Acipenser stellatus</i>		78	65	0,99434	0,01642			
<i>Huso ponticus huso</i>	Marea Neagră	18	16	0,98693	0,01603	75	41	34
<i>Huso caspicus huso</i>	Marea Caspică	25	21	0,98333	0,01633			
<i>Huso huso</i>		43	36	0,98782	0,01671			

n = număr de indivizi; H = număr de haplotipuri; H_d = diversitate haplotipică; P_i = diversitate nucleotidică.

Indicele de diversitate haplotipică (H_d) arată unicitatea unui haplotip în cadrul unei populații. Pentru *Acipenser gueldenstaedtii*, valorile obținute pentru diferitele subspecii au fost cuprinse între 0,83333-0,97436, cu o medie de 0,9617. Pentru *Acipenser stellatus* valoarea H_d a variat între 0,93333 și 0,99341, cu o medie de 0,99434, în timp ce pentru *Huso huso* valoarea medie a diversității haplotipice a fost de 0,98782.

Diversitatea haplotipică a fost semnificativă pentru toate populațiile de sturioni analizate, prezentând o valoare intraspecifică mai mare de 0,95. În schimb, diversitatea nucleotidică (P_i) a fost scăzută, cele mai mari valori fiind înregistrate pentru populațiile de nisetru. Valorile scăzute ale P_i evidențiate de analizele efectuate pot reprezenta consecința divergenței relativ recente între populațiile de sturioni sau a unui eveniment de tip "bottleneck" petrecut în cursul evoluției acestor specii.

Analiza de tip PAA efectuată numai în cazul haplotipurilor unice identificate cu ajutorul programului DNAsp nu a indicat în cadrul setului de secvențe analizate prezența unor diferențe nucleotidice fixe care să fie asociate cu proveniența indivizilor dintr-un anumit bazin (Figurile 116-118). Analiza efectuată nu a evidențiat existența unor situsuri nucleotidice cu rol diagnostic care ar putea reprezenta un caracter distinctiv din punct de vedere filogenetic dacă sunt comune tuturor indivizilor care fac parte dintr-o unitate ESU ipotetică, fie că este vorba de o subspecie sau o populație alopatrică. Astfel, datele moleculare nu au susținut împărțirea celor trei specii de sturioni în subspecii.

		11	1111111111	1111111111	1122222233	3333333333	3333333334	444444	
		2134455555	4777888888	2223334455	5556677888	9999999999	0022233457	8888889999	111111
		9034902147	9249412779	0490242901	2347990499	0107767824	3919647499	0123480679	012549
		CACCATAGTT	CCTGGCTGAA	ATTATATACA	TAGGTTGGTC	CTAGTCTCCA	AGCAGATAGT	TC-GGTTTCT	TCTGTT
	Arow1	T.....	G.....	C.C.....	CG..CC...T	TC.....T		TT.....T	...CC
	Arow3	T.....	CC.....	G.C.....	T.....	...G...G..	T-.....TC		
	Arow4	T.T.....	T.....	CC.....	G.C.....	T.....	...G...G..	T-.....TC	
	Bl1a1	T.TT.....	G.....	C.C.....	CG..CC...T	TC.....T		TT.....T	...CC
	Bl1a2	T.T...AC..	T...T....	CS.....	G.S.C.A...T		...G...G..	T-...C.T	C
	Bl1a9	T.T.G.....	G.....	C.C.....	CG..CC...T	TC.A.T.T..		T-.....T	C.....C
	Bl1a10	T.....	T.....	CCG.C.....	G.C.....	...TG...GA..	T-A...C.T		
	Bl1a12	T.T.G.....	G.....	C.C.....	CG..CC...T	TC.A.T.T..		T-.....T	C.....C
	Dan171_Agu	T.....		C.CG.....	CG..CC...T	TCG.....	...G.....	T-.....T	C.....C
	Dan72_Agu	T.....		G.....	...A.C.C..		C.A-.....TC	C	
	Dan29_Agu	T.....		C.C.....	C.A...C...T	TC...T....	...AG.....	C.A-.....T	C.....C
	Dan118_19_Agu	T.....		G.....	...AA.C.C..		C.A-.....TC	C	
	Casp1	T.T...G.C..	...A...A.G	...C...G.G	GA.C...C-	...AC.C.G	GA.....G..	CT-AA.C.TC	T....
	Casp2	T...A.C.....	C.....	...T.....	G.....CT		...A.....	CT-.....CT	...CC
	Casp3	T.T...G.C..	...A...A.G	...C...GTG	GA.C...C-	...AC.C.G	GA.....G..	CT-AA.C.TC	T....
	Casp4	T.T.....		...C.....	...C.....		...T-.....T	T....C	
	Casp5	T.T.....	G...A.....	C.C.....	CG..C...T	TC.A...T..		T-.....T	C
	Casp6	T.....		...C.....	...C.....		...T-.....T	C	
	Casp8	T.T...G.C..	...A...A.G	...C...G.G	GA.C...C-	...AC.C.G	GA.....G..	CT-AA.C.TC	T....
	Casp9	T.....		C.....	G..CC..CT		...C.C.C	T-.....TC	C.....C
	Casp10	T.....		C.C.....	CG..C...T	TC...T....	...AG.....	T-.....T	T....
	Casp12	TG...C.....	...C.....T	G..CC..CT	...A.TC.A		C.T-.....T	C	
	Casp13	T.....	C.....	C.....	CG..C...CT	T....	...A.C...T	...CA..	
A. gueldenstaedtii colchicus									
A. gueldenstaedtii gueldenstaedtii									

Figura 116. Siturile variabile identificate la nivelul regiunii de control prin alinierea haplotipurilor unice la *Acipenser gueldenstaedtii* (Dudu et al., 2014).

		111	1111222233	3333333333	3333444444	4444444445	5555555556	666666	
		112223444	4578889224	5788136890	0112245666	8889012335	5566777790	0013455660	01234
		3080467013	4420890590	7901299156	9014512019	0498033590	5767123654	5632301144	64533
		TTTTAGGG-	ATTGSIICC	ATTGSIACG	GCTAATGTA	ACGCTCTGTC	TTTAGGTAT	ACCAAAITTT	TGGTT
H. huso poticus	Bla1	A-	-C.....	A.....	A.....	A.....	A.....	A.....	
	Bla2	A-	-C.....	A.....	A.....	A.....	A.....	A.....	
	Bla3	.C.C.....	C..	G.....GT..	A.....CC..	G.....I.....	A.C..	.T.....CC..	.AAC.
	Bla4	A-	A.....	A.....	A.....	C.....	C.G.	G.....	
	Bla5	.C.C.....	G..	GT..	A.....CC..	G.....I.....	C..	.T.....C..	.AAC.
	Bla6	A-	A.....	A.....	A.....	A.....	C..	G.....	
	Bla7	A-	A.....	.CC.A..TG.	A.....CC..	.T.....I.....	A.C..	.T.G.....	.A..
	Bla8	A-	A.....	.CC.A..TG.	A.....CC..	.T.....I.....	A.C..	.T.G.....	.A..
	Bla11	A-	A.....	A.....	A.....	C.....	C..	G.....C	
	Dan5	A-	A.....	C.T..	A..G..A..	A.....	C..	G.....	.A..
	Dan71120	A-	A.....	A.....	A.....	A.....	C..	G.....	.A..
Dan276	.C.C.....	G..	GT..	A.....CC..	G.....I.....	C..	.T..G.C.....	.AAC.	
Dan278	A-	A.....	G..	A.....C..	G.....	C..	G.....		
Dan280	A-	A.....	A.....	A.....	C.....	C..	G.....		
Dan281	A-	A.....	A.....	A.....	C.....	C..	G.....		
Dan283	.C.....	A.....	A.....	A.....	C.....	C..	GG.....	C...	
H. huso caspicus	Casp1	A-	A.....	A.....	A.....	C.....	G.....	G.....	
	Casp2	A-	I.....	C.T..	A.....C.....	A.....	C..	G.....	
	Casp3	A-	A.....	A.....	A.....	C.....	C..	G.....	
	Casp5	A-	A.....	.C..A..G.	A.....CC..	A.....	C..	G.C.....	.AACCC
	Casp6	A-	A.....	.CC.A..TG.	A.....CC..	.T.....I.....	C..	G.....	.A..
	Casp7	A-	I.....	C.T..	A.....C.....	A.....	C..	G.....	.A..
	Casp8	GA..G	T.....	.C.....T.A	A.....CACC.	T.....T	C..	G.....	
	Casp9	A-	A.....	A.....	A.....	C.....	C..	GG.....	C.
	Casp10	A-G	T.....	C.T..	A.....C.....	A.....	C..	G.....	
	Casp11	A.....	A.....	C.T..	A..G..CC.	C.....	G..C..	GG.C.....	.A.C.
	Casp12	A-A--	.C..C..T	T.....	AGC.....	A.....	T.....	G..C..	
	Casp13	A-	I.....	C.T..	A.....C.....	A.....	C..	G.....	
	Casp14	A..G	C.....	TG..	A.....ACCG	.TA.....	G.AC..	.T.G.....	
	Casp15	A-	A.....	.CC.A..TG.	A.....CC..	.T.....I.....	C..	G.....	.A..
	Casp16	G..G	T.....	C.T..	A.....C.....	A.....	C..	G.....	
	Casp17	GA..A	C.....	.C.....T.A	A.....CACC.	T.....T	C..	G.....	
	Casp19	A-	A.....	.CC.A..TG.	A.....CC..	.T.....I.....	C..	G.....	.A..
	Casp21	A-	A.....	A.....	A.....	C.....	C..	GG.....	
	Casp22	A-	A.....	C.T..	A..G.....	A.....	C..	G.....	.A..
Casp23	A-	A.....	.C..A..G.	A.....CC..	T.....	C..	G.C.....	.A.C.	

Figura 117. Siturile variabile identificate la nivelul regiunii de control prin alinierea haplotipurilor unice la *Huso huso* (Dudu et al., 2014).

[illegible]

Figura 118. Siturile variabile identificate la nivelul regiunii de control prin alinierea haplotipurilor unice la *Acipenser stellatus* (Dudu et al., 2014).

Diferențierea genetică și fluxul de gene între subspecii/ populații

Divergența între populații a fost estimată sub forma unor indici statistici, cum ar fi indicele de fixare Wright (F_{st}), care poate lua valori cuprinse între 0 (lipsa diferențierii genetice) și 1 (diferențiere completă între populații).

Pentru o interpretare cât mai exactă a datelor legate de diferențierea genetică între diferitele populații de sturioni a fost calculat și indicele Γ_{st} care este mai potrivit când sunt analizate date haplotipice mitocondriale (Weir și Cockerham, 1984). Valorile înregistrate pentru indicii statistici analizați au fost similare și au indicat o diferențiere genetică scăzută până la moderată între populații (Tabel 17).

Tabel 17. Valorile indicilor statistici care ilustrează gradul de diferențiere genetică și fluxul de gene între subspecii/ populații (Dudu et al., 2014).

Specie	Populația 1 (Subspecie)	Populația 2 (Subspecie)	H_s	K_s	Γ_{st}	F_{st}	N_m
<i>Acipenser gueldenstaedtii</i>	Marea Neagră (<i>Acipenser gueldenstaedtii colchicus</i>)	Marea Azov (<i>Acipenser gueldenstaedtii colchicus</i>)	0,84571*	2,83066*	0,07656	0,08422	5,44
	Marea Neagră (<i>Acipenser gueldenstaedtii colchicus</i>)	Marea Caspică (<i>Acipenser gueldenstaedtii gueldenstaedtii</i>)	0,9057**	3,10564***	0,13096	0,16998	2,44
	Marea Azov (<i>Acipenser gueldenstaedtii colchicus</i>)	Marea Caspică (<i>Acipenser gueldenstaedtii gueldenstaedtii</i>)	0,95266 (ns)	3,30015 (ns)	0,08312	0,10834	4,11
	Marea Neagră + Marea Azov (<i>Acipenser gueldenstaedtii colchicus</i>)	Marea Caspică (<i>Acipenser gueldenstaedtii gueldenstaedtii</i>)	0,92957**	3,15148**	0,11413	0,14836	2,87
<i>Acipenser stellatus</i>	Marea Neagră (<i>Acipenser stellatus ponticus</i>)	Marea Azov (<i>Acipenser stellatus donensis</i>)	0,98944**	2,50758*	0,02863	0,02940	8,25
	Marea Neagră (<i>Acipenser stellatus ponticus</i>)	Marea Caspică (<i>Acipenser stellatus stellatus</i>)	0,98821 (ns)	2,62656 (ns)	0,02695	0,00825	30,07
	Marea Azov	Marea Caspică	0,97833*	12,22485	0,04130	0,02740	8,87

	(<i>Acipenser stellatus donensis</i>)	(<i>Acipenser stellatus stellatus</i>)		(ns)			
<i>Huso huso</i>	Marea Neagră (<i>Huso huso ponticus</i>)	Marea Caspică (<i>Huso huso caspicus</i>)	0,98481 (ns)	2,46697*	0,04016	0,03411	7,

H_s – diferențiere genetică bazată pe haplotipuri; K_s- diferențiere genetică bazată pe secvențe; F_{ST}, Gamma_{ST} – indici de diferențiere genetică; N_m-flux de gene.

Semnificație statistică: * 0,01<P<0,05; ** 0,001<P<0,01; *** P<0,001; ns - nesemnificativ.

Valorile înregistrate pentru indicele F_{st} în cazul speciilor *Acipenser stellatus* și *Huso huso* au fost mai mici decât 0,1, indicând o divergență scăzută între populații, în ciuda originii geografice diferite și avansând ipoteza că populațiile studiate aparțin în fapt aceleiași populații panmictice. În schimb, valorile au fost relativ ridicate și semnificative din punct de vedere statistic pentru populațiile de *Acipenser gueldenstaedtii*, indicând un oarecare grad de diferențiere între subspeciile/ populațiile acestei specii. Cea mai mică valoare a F_{st} în cazul *Acipenser gueldenstaedtii* a fost înregistrată pentru populațiile din Marea Neagră și Marea Azov, valorile obținute pentru celelalte perechi de populații analizate fiind mai mari de 0,1.

Pentru a testa existența subspeciilor în cadrul acestei specii am analizat ca și grupuri distincte *Acipenser gueldenstaedtii colchicus* (din Marea Neagră și Marea Azov) și *Acipenser gueldenstaedtii gueldenstaedtii* (din Marea Caspică). În acest caz valorile indicilor statistici au indicat, de asemenea, o diferențiere moderată între cele două subspecii. Cu două excepții, valorile N_m derivate din F_{st} sunt mai mari decât 4, ceea ce indică că a existat un flux de gene între populațiile aceleiași specii.

În concluzie, pentru populațiile în cazul cărora a fost evidențiat un grad moderat de diferențiere, fluxul de gene a fost limitat, în timp ce, în mod contrar, pentru populațiile pentru care a fost înregistrată o divergență genetică scăzută a fost evidențiat un flux semnificativ de gene.

Rețele haplotipice

Rețelele haplotipice construite pe baza secvențelor regiunii de control mitocondriale au ilustrat relațiile genealogice între haplotipurile identificate la cele trei specii de sturioni din regiunea Ponto-Caspică (Figura 119). Forma rețelelor indică o structură complexă cu numeroși vectori mediani (cercuri negre) și cu majoritatea haplotipurilor având caracteristicile unora vechi (frecvență scăzută, prezente într-un

singur bazin, conectate prin pași mutaționali numeroși). De asemenea, puține haplotipuri sunt împărțite între indivizii care aparțin unor bazine diferite.

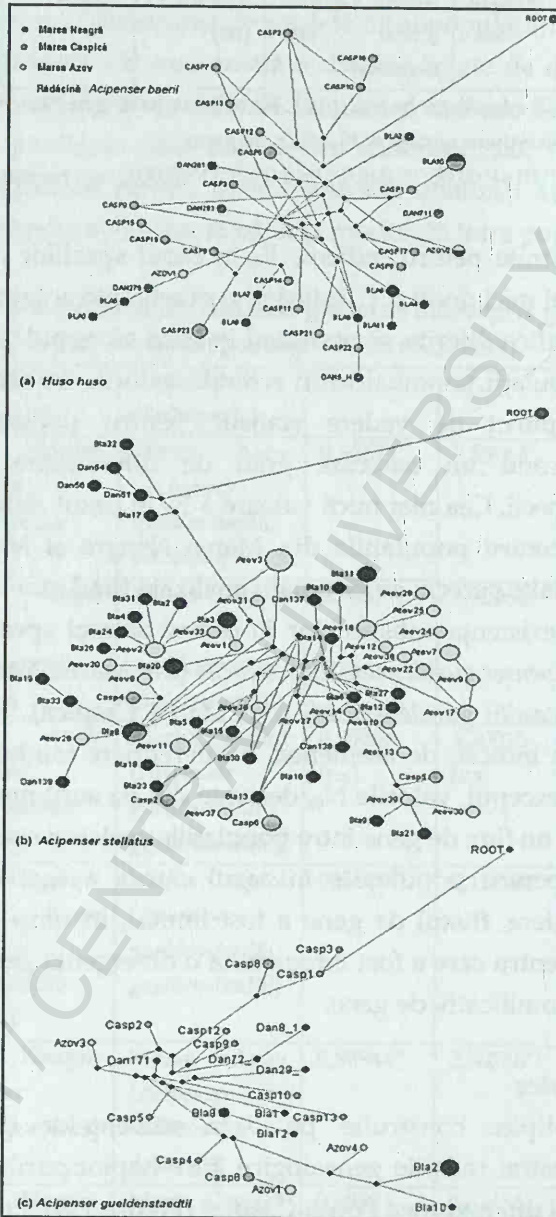


Figura 119. Rețele haplotipice construite pe baza haplotipurilor regiunii *D-loop* la (a) *Huso huso*, (b) *Acipenser stellatus*, (c) *Acipenser gueldenstaedtii* (Dudu et al., 2014). Mărimea cercurilor este direct proporțională cu frecvența haplotipurilor. Lungimea ramurilor este direct proporțională cu numărul de substituții nucleotidice per situs.

Analiza moleculară a subspeciilor corespunzătoare celor trei specii analizate nu susține ipoteza diferențierii acestora, propusă de unii autori, pe baza unor diferențe morfometrice, meristice și ecologice (Birstein și Bemis, 1997). Clasificarea taxonomică propusă pe baza criteriilor enunțate anterior nu este unanim acceptată.

Astfel, atât registrul internațional al speciilor marine WoRMS (*World Register of Marine Species*), cât și nomenclatorul zoologic internațional nu acceptă încadrarea sistematică decât până la rangul de specie. Totuși, confirmarea sau infirmarea acestei clasificări este foarte importantă pentru coordonarea unor programe eficiente de conservare a acestor specii extrem de periclitate. În urma studiului efectuat, nu am găsit dovezi genetice care să susțină o divergență semnificativă între populațiile analizate și astfel, datele noastre nu au putut susține clasificarea în subspecii.

Analiza de tip PAA nu a evidențiat existența unor unități semnificative din punct de vedere evolutiv, deși gradul de încredere în rezultatele obținute crește odată cu numărul de indivizi analizați. Un studiu efectuat de Walsh (2000), consideră că numărul critic de indivizi pentru un studiu care își propune identificarea unor situsuri de diagnostic în cadrul speciilor este egal cu 59. Din păcate, obținerea unui număr mare de probe în cazul sturionilor este foarte dificilă, datorită faptului că populațiile sunt reduse din punct de vedere numeric. De asemenea, faptul că analiza PAA nu a evidențiat prezența unor caractere fixe, cu rol de diagnostic, în cadrul subspeciilor nu exclude faptul că respectivele haplotipuri sunt exclusive pentru o anumită subspecie.

Toate cele trei specii de sturioni investigate prezintă o diversitate haplotipică semnificativă, cu valori cuprinse între 0,96 și 0,99. Diversitatea nucleotidică (Π) înregistrată este scăzută spre moderată, cea mai mare valoare (0,04494) fiind obținută pentru *Acipenser gueldenstaedtii*. Aceasta este comparabilă cu valoarea înregistrată de Khoshkholgh et al. (2011) în cazul speciei *Acipenser persicus*, utilizând ca marker regiunea mitocondrială de control. Deși diversitatea nucleotidică calculată la nivel de specie/subspecie/populație este mai degrabă redusă, exceptând *Acipenser gueldenstaedtii*, valorile obținute sunt semnificativ mai mari decât cele pentru alte specii de sturioni, ca de exemplu, *Acipenser brevirostrum* (Grunwald et al., 2002) sau *Acipenser oxyrinchus oxyrinchus* (Wirgin et al., 2005).

În ciuda ariei mari de distribuție a speciilor și a presupuselor subspecii asociate cu anumite bazine hidrografice, rezultatele obținute au indicat o diferențiere genetică redusă și un flux de gene semnificativ între indivizii cu proveniență geografică diferită. Atunci când fluxul de gene între populații depășește un anumit nivel poate

încetini sau chiar împiedica procesul de diferențiere genetică și rezultă o structură genetică redusă a populațiilor distribuite pe arii geografice extinse. Rezultatele analizelor de diferențiere genetică și flux de gene reprezintă argumente care contestă existența subspeciilor asociate cu bazine hidrografice diferite.

În contrast cu rezultatele anterioare, rețelele haplotipice au evidențiat o structură genetică distinctă a populațiilor investigate. Reprezentarea grafică a haplotipurilor în cadrul rețelelor sugerează că acestea au caracteristicile unora vechi și foarte puține sunt împărțite între bazine (două dintre cele 36 de haplotipuri pentru morun, unul dintre cele 65 de haplotipuri pentru păstrugă și nici unul dintre cele 23 de haplotipuri pentru nisetru). În ciuda faptului că rețelele nu prezintă o formă de tip *star-like*, ci una care sugerează o puternică admixie a indivizilor, pe baza argumentelor anterioare, considerăm că rețelele reflectă existența unei structuri genetice în cadrul speciilor de sturioni investigate corelată cu originea geografică și acest fapt susține împărțirea acestora în populații alopatrice. Acest aspect este observat în special în cazul nisterului, specie care prezintă multiple morfe și forme biologice, inclusiv populații rezidente de apă dulce și forme migratoare de primăvară, respectiv toamnă (Sokolov și Tspekin, 1996).

Lipsa de diferențiere și fluxul de gene considerabil observat reprezintă consecința unor schimburi de informație genetică între populații mediate de conexiunile stabilite între cele trei bazine, dar mult mai probabil se datorează influenței antropice.

Originea grupului de sturioni cu distribuție Ponto-Caspică se află probabil în Marea Thetys și Marea Paratethys care se aflau pe teritoriul actual al Mării Negre, Mării Azov, Mării Caspice și Lacului Aral, acum 15 milioane de ani (Jones și Simmons, 1996). *Acipenser gueldenstaedtii* sau ancestorul acestuia au apărut în acea perioadă, în timp ce formarea celorlalte specii din cadrul grupului s-a produs în Miocenul Superior – Pleistocenul Superior ca rezultat al schimbărilor geologice globale și a schimbărilor de mediu din această zonă. Marea Caspică a rămas principalul refugiu al speciilor de sturioni în perioada 15–1,5 milioane de ani în urmă. Speciile anadrome *Acipenser gueldenstaedtii*, *Acipenser stellatus* și *Huso huso* probabil au migrat în mod repetat din Marea Caspică în Marea Neagră și Marea Azov prin strâmtorile dintre acestea în timpul ultimilor 1,5 milioane de ani (Doukakis et al., 1999). Aproximativ în același timp, sturionii au început să migreze din Marea Neagră în Dunăre pentru reproducere. La ora actuală mările Azov și Caspică sunt conectate prin strâmtoarea Kerci, existând posibilitatea ca indivizii aparținând celor două populații să intre în contact. Mai mult, se apreciază că speciile

de sturioni din Marea Caspică sunt amenințate cu alterarea genetică prin contactul acestora cu sturionii din Marea Neagră prin canalul Volga-Don.

În lumina istoriei evolutive a grupului de sturioni din regiunea Ponto-Caspică, dar și a interacțiunilor dintre specii în cadrul istoriei lor recente, este posibil ca diferențierea genetică redusă să fie consecința schimbului genetic mediat prin legăturile existente între cele trei bazine atât în prezent, dar mai ales, la o scală semnificativă acum circa 13.000-20.000 de ani (Zubakov, 1988).

O altă modalitate care permite fluxul de gene este reprezentată de intervenția antropică prin repopularea intensivă afluenților celor trei bazine cu indivizi crescuți în acvacultură, cu scopul de a susține refacerea populațiilor naturale aflate în declin. Programe de repopulare au fost și sunt practicate în Federația Rusă, România, Kazakhstan, Azerbaidjan, Iran etc. În fosta Uniune Sovietică programele de repopulare au început în anii '60 drept consecință a limitării situsurilor de reproducere a acestor specii în urma construcției de hidrocentrale (Doukakis et al., 2005). Se consideră că aproape toți indivizii de morun din Volga provin din acvacultură. Există date care susțin că au fost efectuate repopulări masive în Marea Caspică, din moment ce 91% din indivizii fiecărei generații de morun provin de asemenea din acvacultură (Khodorevskaya et al., 2009). În cazul nisetruului, s-a raportat că la începutul anilor '90, 30-55% din stocul Mării Caspice provenea din acvacultură (Khodorevskaya et al., 2000).

În special în trecut, repopulările au fost efectuate fără a se ține cont de originea genitorilor implicați în obținerea puietului și fără o caracterizare din punct de vedere genetic a indivizilor. În acest context, rezultatele noastre nu sunt deloc surprinzătoare, iar structura genetică atipică a populațiilor investigate este cel mai probabil consecința repopulărilor necontrolate cu indivizi având diferite origini geografice. Astfel, aproximativ jumătate din sturionii eliberați anual din cele cinci ferme de sturioni din zona Mării Azov își aveau originea în Marea Caspică. Aparent, aceasta era o practică des întâlnită mai ales pentru speciile păstrugă și nisetru. În cazul păstrugii, eliberarea de icre fertilizate de la indivizi provenind din Marea Caspică în afluenții Mării Azov a afectat sever integritatea genetică a populației native (Chebanov et al., 2002).

În concluzie, putem afirma că pe baza analizei markerului mitocondrial *D-loop* a fost observată o diversitate genetică însemnată a populațiilor analizate, dar cu excepția *Acipenser gueldenstaedtii*, există un grad de diferențiere extrem de redus între populații.

Datele moleculare nu au susținut existența subspeciilor asociate celor trei bazine și reflectă o compoziție genetică heterogenă a populațiilor, cel mai probabil ca urmare a efectuării unor repopulări necontrolate.

Efectuarea unui studiu efectuat pe probe colectate înainte de demararea programelor de repopulare și care acum fac parte din colecțiile diferitelor muzee ar fi deosebit de utilă pentru a clarifica dacă lipsa de diferențiere genetică între populații este rezultatul modificărilor geologice produse în cursul evoluției acestora sau într-adevăr reprezintă consecința intervențiilor antropice.

Din păcate, nu au fost identificate unități de tip ESU, ceea ce limitează recomandările pentru conservare. Pentru o detecție corectă a unor astfel de unități utile în conservare ar trebui analizat un număr mai mare de indivizi, dar acest fapt constituie un adevărat impediment ținând cont de statusul actual al populațiilor de sturioni și de dificultatea cu care se realizează prelevarea de probe biologice.

VI.6 Aplicații ale utilizării ARN în criminalistică

Studiile de biologie moleculară cu aplicații în domeniul criminalistic s-au axat în ultima decadă pe dezvoltarea tehnicilor de analiză ADN, tehnicile bazate pe determinări ARN fiind abia la început. Motivele pentru o asemenea discrepanță țin atât de uriașele descoperiri realizate în domeniul aplicațiilor tehnologiilor ADN în criminalistică, dar și de un oarecare tradiționalism în practicarea autopsiilor în cadrul institutelor de medicină legală. În plus, ARN este renumit pentru instabilitatea sa *in vitro* și implicit postmortem.

Totuși, dezvoltarea unor tehnici de biologie moleculară axate pe ARN care au dovedit un potențial enorm al datelor obținute din acest sector, precum și descoperirea unor condiții care conferă o stabilitate nesperat de mare a ARN *in vivo* au stimulat studiile de criminalistică în direcția dezvoltării de noi aplicații în acest domeniu. Cercetările s-au axat pe dezvoltarea de metode care să permită identificarea originii fluidelor corporale, investigarea modificărilor înregistrate la nivel molecular în procesul de vindecare al rănilor cu posibilitatea stabilirii vârstei acestora, determinarea vârstei petelor de sânge, stabilirea intervalului postmortem (PMI), precum și stabilirea unui diagnostic care să ajute la stabilirea cauzei morții (Bauer, 2007).

Stabilitatea ARN postmortem

După moarte, procesul de degradare a ARN este inițiat fie de ribonucleazele deja prezente în celulă, fie de cele de origine bacteriană, corelate cu procesul de descompunere naturală. Instabilitatea ARN este cu atât mai mare cu cât molecula sa monocatenară nu este protejată de complexe proteice. Organele care prezintă constitutiv activitate ribonucleazică intensă (ficatul, pancreasul) vor prezenta o degradare ARN rapidă, în timp ce în creier stabilitatea ARN se poate întinde până la 96 de ore postmortem. O stabilitate ARN prelungită a fost identificată și în probe de țesut pulmonar izolate de la nou născuți, de țesut osos uman, de retină sau de sânge (Bauer, 2007).

Cercetări realizate de echipe independente au evidențiat că se poate extrage ARN și la intervale mai mari de 96 de ore de la momentul decesului, cu precizarea că s-a observat în paralel și o intensificare a procesului de fragmentare (Bauer, 2007; Virkler și Lednev, 2009). Totuși, marea majoritate a moleculelor de ARN prezintă o stabilitate care permite utilizarea lor în studii criminalistice.

S-a încercat de asemenea să se stabilească în ce măsură există corelații între nivelul transcripților ARN din cadrul aceluiași creier. Rezultatele au fost promițătoare sugerând existența unor rapoarte cantitative constante pentru același creier, chiar dacă nivelul transcripților ARN variază mult între indivizi. Factori agonici (cum ar fi coma, hipoxia) ce afectează creierul uman precum și intervalul postmortem afectează stabilitatea ARN extras. În plus, unele studii sugerează importanța valorii de pH a țesutului asupra integrității ARN (Bauer, 2007; Virkler și Lednev, 2009).

Dacă într-adevăr factorii agonali influențează integritatea ARN postmortem, dar și expresia genică premortem, în acest caz ARN devine deosebit de util atât pentru determinarea PMI (și în acest caz permite o determinare mai exactă a momentului înregistrării decesului), dar și pentru tehnici de diagnosticare care să permită stabilirea unei cauze a morții (Bauer, 2007). Într-o primă etapă, evaluarea integrității ARN se baza pe migrarea electroforetică în gel de agaroză a extractelor ARN, evidențierea a două benzi clare corespunzătoare transcripților ARNr 18S respectiv ARNr 28S fiind considerată dovada clară a menținerii integrității extractelor realizate. Ulterior tehnici de electroforeză capilară au permis o izolare mai clară a celor două benzi de ARN utilizând o cantitate mult mai mică de probă.

Inițial se aprecia că raportul ARN 28S/18S trebuie să fie de aproximativ 2 pentru a considera extractul ARN integru. Totuși s-a considerat necesară introducerea unei modalități care să cuantifice integritatea ARN extras pe baza unui

scor care să includă factori complecși de diagnosticare a integrității, nu numai prezența celor două benzi de ARNr și raportul asociat lor, dar și prezența/absența produșilor de degradare, profilul complet de migrare ARN funcție de masă etc. Astfel, cu ajutorul softurilor produse de compania Agilent, a fost introdus scorul de integritate ARN (RIN - *RNA Integrity Number*) care măsoară pe o scală de la 1 la 10 integritatea ARN.

Identificarea originii fluidelor corporale

Analizele ADN din pete identificate la locul crimei permit determinarea profilului ADN al individului de origine precum și sexul acestuia. Analizele ADN nu permit mai departe identificarea țesutului de origine al acestor pete, ceea ce prezintă o importanță vitală în cazurile criminalistice unde se dorește discriminarea dintre sângele provenit în urma unui viol și sângele menstrual, identificarea secrețiilor vaginale sau salivare etc. Pentru identificarea probelor de material seminal există în prezent un test bazat pe determinarea antigenului specific de prostată (PSA) prezent în multiple fluide corporale la bărbați, dar al cărui nivel este semnificativ crescut în materialul seminal chiar și la indivizii care au apelat la operații de vasectomie sau care prezintă azoospermie (absența spermatozoizilor din lichidul seminal).

Identificarea ARNm specific fiecărui tip de celulă ar prezenta multiple avantaje, beneficiind de o sensibilitate înaltă mulțumită amplificărilor PCR, dar și de o specificitate înaltă datorată existenței unui tipar unic de expresie genică pentru fiecare celulă aparținând unui țesut/organ (Vennemann și Koppelkamm, 2010). În plus, izolarea ADN necesară testelor de profil genetic nu ar fi afectată.

Multiple studii au evidențiat markeri ARNm relevanți în criminalistică pentru marea majoritate a fluidelor corporale ținând cont de diferențele funcționale ale celulelor/țesuturilor de origine. Astfel, pentru metaloproteinazele matriceale provenite din sângele menstrual, o familie de enzime dependente de ioni de zinc, s-a dovedit a fi exprimată specific în endometrul menoreic, permițând astfel discriminarea acestuia de sângele nonmenstrual. Ținând cont de faptul că petele de sânge reprezintă cel mai frecvent tip analizat de dovadă criminalistică, patentarea acestor teste prezintă o importanță deosebită (Bauer, 2007; Virkler și Lednev, 2009; Vennemann și Koppelkamm, 2010). De asemenea, dezvoltarea unor teste suplimentare de identificare a materialului seminal sau a salivei ar prezenta o importanță deosebită pentru sectorul criminalistic. În tabelul 18 sunt prezentați câțiva markeri de interes pentru identificarea originii fluidelor corporale prin intermediul unei reacții PCR multiplex.

Tabel 18. Markeri moleculari utili pentru identificarea fluidelor corporale.

Fluid corporal analizat	Markeri moleculari determinați prin PCR
Sânge	β -spectrină (SPTB) Hemoglobină α locusul 1 (HBA)
Sânge menstrual	Metaloproteinaza matriceală 7 (MMP-7) Metaloproteinaza matriceală 11 (MMP-11)
Salivă	Staterină (STATH) Histatină 3 (HTN3)
Material seminal	Protamină 1 (PRM1) Protamină 2 (PRM2) Kalikreină 3 (KLK = PSA)
Secreții vaginale	β -defensină umană 1 (HBD-1) Mucină 4 (MUC4)

Alte studii s-au axat pe determinarea vârstei indivizilor de la care provin probele biologice pornind de la analize de biologie moleculară. S-a putut astfel determina că o serie de gene prezintă o expresie specifică pentru diferite categorii de vârste, cum ar fi gene care codifică pentru proteine ale mușchiului scheletic (Bauer, 2007; Virkler și Lednev, 2009). Cea mai mare problemă asociată acestor teste este prezența rezultatelor fals negative care se pot datora degradării probelor sau unor erori în cuantificarea rezultatelor prin qPCR.

Determinarea vârstei unei răni

Există patru aspecte care se doresc urmărite în acest caz: ordinea în care au fost produse rănilor, discriminarea dintre rănilor apărute pre-, respectiv postmortem, timpul de supraviețuire după inducerea unei răni letale și asocierea dintre un anumit incident și o rană produsă.

În prezent, toate determinările la nivel molecular axate pe răni interne/externe țin cont de modificările apărute la nivel molecular în zonele periferice ale rănilor. În ultima decadă a secolului 20, analiza rănilor se baza în principal pe metode imunohistochimice care urmăreau identificarea celulelor imunitare infiltrate la nivelul răni. În ultimi ani testele au început să se axeze pe identificarea modificării profilului de transcripție și a nivelului de transcripție în urma producerii unui traumatism la nivel tisular cu afectarea întregii populații de celule locale. Studiile vor trebui însă să stabilească dacă tehnicile ARN utilizate sunt compatibile cu cerințele criminalistice și de asemenea vor trebui identificați markerii semnificativi din punct

de vedere criminalistic pentru procesul inflamatoriu asociat rănirii (Bauer, 2007; Virkler și Lednev, 2009).

Rezultate promițătoare indică o amplificare a transcrierii factorului de creștere al fibroblastelor care atinge valoarea maximă la 48 de ore de la producerea rănii. În țesutul de origine cerebrală activatorul plasminogenului țesut-specific înregistrează de asemenea o amplificare transcripțională maximă la o oră după producerea traumei (Bauer, 2007; Virkler și Lednev, 2009). Un alt factor important pare să fie interleukina 10. Teste vizând expresia altor citokine în urma inducerii de răni la șoareci, realizate prin teste de RT-PCR și hibridizare *in situ*, au urmărit modificări de expresie ale IL1- α , IL1- β , IL6, TNF α , observându-se profile diferite de activare transcripțională pentru fiecare în parte. Totodată, studii recente au putut stabili de asemenea modificări de expresie genică la numai 30 de minute de la strangulare, prin teste de FDD-PCR (*Fluorescent Differential Display PCR*) (Bauer, 2007; Virkler și Lednev, 2009).

Datorită labilității lor, moleculele de ARN pot reprezenta un marker important în determinarea momentului morții, permițând o apreciere fină, corespunzătoare intervalului din primele 24 de ore până la debutul procesului de descompunere. Se consideră că moleculele de ARN prezintă o stabilitate considerabilă în primele 24-36 de ore după deces cu condiția ca materialul biologic să fie depozitat în condiții ambientale (Bauer, 2007). În plus, stabilirea ratei de degradare a ARN prin *Real Time* PCR este considerată a fi mai eficientă decât metoda electroforetică de comparare a ariei benzilor de ARNr 18S, respectiv 28S (Bauer, 2007; Virkler și Lednev, 2009).

Determinarea vârstei petelor

În prezent nu există o metodă care să permită determinarea vârstei petelor de sânge observate la locul crimei care să permită o cuantificare a duratei de interes pe intervale mici. Majoritatea metodelor dezvoltate în trecut se bazează pe determinarea degradării hemoglobinei, fiind înregistrate modificările de culoare și solubilitate ale compușilor de degradare. Metoda nu poate fi aplicată deci pentru determinarea vârstei probelor de material seminal, salivă etc.

O metodă grosieră de determinare a vârstei petelor de sânge a fost bazată pe difuzia ionului de clor fixat sub formă de clorură de argint, în urma reducerii sale formându-se un inel negru la periferia petelor mai vechi de 2 luni, lățimea sa crescând semnificativ pentru probele mai vechi de 9 luni.

Apelând la tehnica *Real Time* PCR s-a stabilit că un simplu raport al transcripților (reverstranscriși și cuantificați) ARN 18S și ARN pentru β -actină (genă

house keeping) poate permite aproximarea vârstei petelor de sânge păstrate în condiții constante de mediu și umiditate pe o perioadă de circa 150 de zile (Bauer, 2007). Astfel, ARNr 18S a prezentat o stabilitate impresionantă pe întreaga perioadă (probabil datorită asocierii sale cu proteinele ribozomale), în timp ce ARNm pentru β -actină se degradează mult mai rapid (Bauer, 2007).

În principiu, fragmentarea ARN continuă *in vitro* chiar dacă materialul biologic a fost complet deshidratat, procesul fiind lent și prezentând o dinamică variabilă. Testele actuale permit o diferențiere grosieră, identificând petele recente (sub 1 an) sau vechi (peste 8 ani). De aceea sunt necesare teste suplimentare care să evidențieze dinamica procesului de degradare ARN în funcție de condițiile de mediu (Bauer, 2007).

Statusul funcțional al celulelor/organelor

Modificările morfologice și funcționale apărute în celule/organe cu puțin timp înaintea decesului prezintă un interes mai mare pentru criminaliști decât etiologia și cursul de desfășurare a procesului patologic. Multe mecanisme care conduc la deces nu determină modificări morfologice pentru simplul fapt că mecanismul lor de acțiune afectează funcțional celulele/țesuturile sau durata lor de desfășurare nu este suficient de lungă pentru a permite apariția unor modificări anatomo-patologice vizibile. Statusul funcțional al unei celule este însă redat de profilul său ARNm. Analiza sa reprezintă un instrument valoros în determinarea mecanismelor patologice care au condus la deces (Vennemann și Koppelkamm, 2010). Intensificarea transcripției ARNm pentru anumiți efectori este reglată rapid, în intervale de câteva minute, permițând așadar și monitorizarea proceselor acute.

Într-o primă etapă este însă crucial să se verifice gradul de degradare al ARN pentru a se asigura că profilele modificate obținute se datorează procesului patologic care a cauzat moartea victimei. Câțiva efectori a căror transcriere este rapid afectată în urma hipoxiei sunt eritropoietina sau factorul de hipoxie inductibil 1 α (Bauer, 2007; Vennemann și Koppelkamm, 2010).

Pentru a evalua eficient statusul funcțional al celulelor analizate ar fi util să se facă uz de microcipuri care să permită analiza simultană a unui număr suficient de mare de gene cunoscându-se faptul că fiecare celulă prezintă un tipar specific de expresie a ARNm, dependent de oxigenare și de rezerva energetică. Teoretic, se pot dezvolta microcipuri care să urmărească profilele ARNm care, introduse în tehnicile standard de autopsiere, să permită compararea profilelor obținute de la victima de interes cu profilele existente în bazele de date pentru diferite boli/mecanisme care pot provoca decesul și care să permită astfel stabilirea cu exactitate a diagnosticului

chiar și în absența unor modificări morfologice specifice (Vennemann și Koppelkamm, 2010). Acest deziderat ar putea fi realizat și prin amplificare în cadrul unor reacții de multiplex *Real Time PCR*, dar markerii investigați trebuie selectați cu atenție.

În concluzie, tehnicile bazate pe analiza ARN cu aplicații în criminalistică trebuie să țină cont de multitudinea de factori care afectează integritatea acestor molecule, printre care se numără intervalul de timp scurs înainte de prelevarea probei biologice, temperatura, valoarea de pH etc. Utilizarea procesului de degradare ARN pentru stabilirea timpului la care a fost înregistrat decesul trebuie să țină cont de toți acești factori și prin urmare sunt necesare experimente suplimentare care să permită standardizarea metodei pentru a putea fi aplicată cu succes în criminalistică. ARN ar putea reprezenta un instrument prețios în stabilirea intervalului post-mortem datorită stabilității sale în primele 24-36 de ore de la deces, servind de asemenea pentru urmărirea modificărilor genice ce pot fi asociate cu cauza morții.

BIBLIOGRAFIE

- Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2002) *Molecular Biology of The Cell*, 4th Edition, Garland Science Taylor & Francis Group, S.U.A.
- Ali S., McClenaghan M., Simons J.P., Clark A. (1990) Characterization of the alleles encoding ovine β -lactoglobulin A and B. *Gene* 91:201-207.
- Allendorf F.W., Luikart G. (2007) *Conservation and the Genetics of Populations*, Blackwell Publishing, Oxford, UK.
- Apostolidis A.P., Loukovitis D., Tsigenopoulos C.S. (2007) Genetic characterization of brown trout (*Salmo trutta*) populations from the Southern Balkans using mtDNA sequencing and RFLP analysis. *Hydrobiologia* 600(1): 169-176.
- Arnold M.L. (1997) *Natural Hybridization and Evolution*. New York: Oxford University Press.
- Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K. (2002) *Short protocols in molecular biology* 5th Ed., John Wiley & Sons, New York, S.U.A.
- Bandelt H.J., Forster P., Röhl A. (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 16:37-48.
- Bao W.B., Wu S.L., Musa H.H., Zhu G.Q., Chen G.H. (2008) Genetic variation at the alpha-1-fucosyltransferase (FUT1) gene in Asian wild boar and Chinese and Western commercial pig breeds. *J. Anim. Breed. Genet.* 125(6):427-430.
- Bauer M. (2007) RNA in forensic science. *Forensic Sci. Int. Genet.* 1:69-74.
- Beckmann J.S., Weber J.L. (1992) Survey of human and rat microsatellites. *Genomics* 12:627-631.
- Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Raufaste N., Bonhomme F. (1996) GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations, Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier, France.
- Belt P.B., Muileman I.H., Schreuder B.E. (1995) Identification of five allelic variants of the sheep PrP gene and their association with natural scrapie. *J. Gen. Virol.* 76:509-517.
- Bernatchez L. (2001) The evolutionary history of brown trout (*Salmo trutta* L.) inferred from phylogeographic, nested clade, and mismatch analysis of mitochondrial DNA variation. *Evolution* 55: 351-379.
- Bertschinger H.U., Stamm M., Vögeli P. (1993) Inheritance of resistance to oedema disease in the pig: experiments with an *Escherichia coli* strain expressing *fimbriae* 107. *Vet. Microbiol.* 35:79-89.
- Birstein V. J., Hanner R., DeSalle R. (1997) Phylogeny of the Acipenseriformes: cytogenetic and molecular approaches. In *Sturgeon Biodiversity and Conservation*, edited by Birstein V. J., Waldman J.R., Bemis W. E., Kluwer Academic Publishing, Netherlands, pp. 127-155.
- Birstein V.J., Bemis W.E. (1997) How many species are there within the genus *Acipenser*? In: *Sturgeon Biodiversity and Conservation*; Birstein V.J., Waldman J.R., Bemis W.E., Ed., Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp. 25-71.

- Birstein V.J., DeSalle R. (1998) Molecular phylogeny of *Acipenserinae*. *Mol. Phylogenet. Evol.* 9:141-155.
- Birstein V.J., Doukakis P., DeSalle R. (2002) Molecular phylogeny of *Acipenseridae*: Nonmonophyly of *Scaphirhynchidae*. *Copeia* 2:287-301.
- Blair M.E., Gutierrez-Espeleta G.A., Melnick D.J. (2013) Subspecies of the Central American squirrel monkey (*Saimiri oerstedii*) as units for conservation. *Int. J. Primatol.* 34(1):86-98.
- Bossers A., Schreuder B.C., Muileman I.H., Belt P.B., Smits, M.A. (1996) PrP genotype contributes to determining survival times of sheep with natural scrapie. *J. Gen. Virol.*, 77: 2669-2673.
- Bowling A.T. (2000) Genetics of colour variation. In: Bowling, A.T. and Ruvinsky, A. Ed. *The Genetics of the Horse*, CABI Publishing, Wallingford, U.K.
- Brown J.R., Beckenbach K., Beckenbach A.T., Smith M.J. (1996) Length variation, heteroplasmy and sequence divergence in the mitochondrial DNA of four species of sturgeon (*Acipenser*). *Genetics* 142:525-535.
- Chebanov M.S., Karnaukhov G.I., Galich E.V., Chmir Y.N. (2002) Hatchery stock enhancement and conservation of sturgeon, with an emphasis on the Sea of Azov populations. *J. Appl. Ichthyol.* 18:463-469.
- Chen K.F., Huang L.S., Li N., Zhang Q., Luo M., Wu C.X. (2000) The genetic effect of estrogen receptor (ESR) on litter size traits in pig. *Yi Chuan Xue Bao* 27:853-857.
- Clark D. (2005) *Molecular Biology*, Elsevier Inc., ISBN 0-12-175551-7.
- Costache M., Dinischiotu A. (2004) *Acizi nucleici - Structură și organizare*, Editura Ars Docendi, București, România.
- Crandall K.A., Bininda-Emonds O.R., Mace G.M., Wayne R.K. (2000) Considering evolutionary processes in conservation biology. *Trends Ecol. Evol.* 15(7):290-295.
- Davis G., Balakrishnan L., Ross I., Wilson T., Galloway S., Lumsden B., Hanrahan J., Mullen M., Mao X., Wang G., Zhao Z., Zeng Y., Robinson J., Mavrogenis A., Papachristoforou C., Peter C., Baumung R., Cardyn P., Boujenane I., Cockett N., Eythorsdottir E., Arranz J., Notter D. (2006) Investigation of the Booroola (*FecB*) and Inverdale (*FecXI*) mutations in 21 prolific breeds and strains of sheep sampled in 13 countries. *Anim. Reprod. Sci.*, 92: 87-96.
- Davis G.H. (2005) Major genes affecting ovulation rate in sheep. *Genet. Sel. Evol.* 37(Suppl. 1):S11-S23.
- Davis J.I. and Nixon K.C. (1992) Populations, genetic variation and the delimitation of phylogenetic species. *Syst. Biol.* 41(4):421-435.
- Davis L.G., Dibner M.D., Battery J.F. (1999) *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier Academic Press.
- DeSilva U., Guo X., Kupfer D.M., Fernando S.C., Pillai A.T., Najar F.Z., So S., Fitch G.Q., Roe B.A. (2003) Allelic variants of ovine prion protein gene (PRNP) in Oklahoma sheep. *Cytogenet. Genome Res.* 102:89-94.
- Di Gregorio P., Rando A., Pieragostini E., Masina P. (1991) DNA polymorphism at the casein loci in sheep. *Anim. Genet.* 22:21-30.
- Doukakis P., Birstein V.J., Ruban G.I., Desalle R. (1999) Molecular genetic analysis among subspecies of two Eurasian sturgeon species *Acipenser baerii* and *Acipenser stellatus*. *Mol. Ecol.* 8(12 Supp.):S117-S127.

- Doukakis P., Birstein V.J., DeSalle R. (2005) Intraspecific structure within three caviar-producing sturgeons (*Acipenser gueldenstaedtii*, *Acipenser stellatus* and *Huso huso*) based on mitochondrial DNA analysis. *J. Appl. Ichthyol.* 21:457-460.
- Dudu A., Georgescu S.E., Dinischiotu A., Costache M. (2010) PCR-RFLP method to identify fish species of economic importance. *Arch. Zootech.* 13(1):53-59.
- Dudu A., Georgescu S.E., Costache M. (2011a) PCR-RFLP Method to Identify Salmonid species of economic importance. *Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies* 44 (1):193-196.
- Dudu A., Suciu R., Paraschiv M., Georgescu S.E., Costache M., Berrebi P. (2011b) Nuclear markers of Danube sturgeons hybridization. *Int. J. Mol. Sci.*, 12(10):6796-6809.
- Dudu A., Georgescu S.E., Costache M. (2014) Molecular analysis of phylogeographic subspecies in three Ponto-Caspian sturgeon species. *Genet. Mol. Biol.* 37(3):587-597.
- Dudu A., Georgescu S.E., Costache M. (2015) Evaluation of genetic diversity in fish using molecular markers. In Caliskan M., Oz C.G., Kavakli H.I., Ozcan B. (Eds.) *Molecular Approaches to Genetic Diversity*, InTech, Croatia, pp. 163-193.
- Erhard, G., Broad, T.E., Hill, D., Pearce, P. (1994) Present status of the ovine gene map (*Ovis aries*); comparison with the bovine map (*Bos taurus*). *Mamm. Genome* 5:324-332.
- Felsenstein J. (2004) PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle.
- Galloway S.M., McNatty K.P., Cambridge L.M., Laitinen M.P., Juengel J.L., Jokiranta T.S., McLaren R.J., Luiro K., Dodds K.G., Montgomery G.W., Beattie A.E., Davis G.H., Ritvos O. (2000) Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nat. Genet.* 25:279-283.
- Garrett R.H., Grisham C.M. (2005) *Biochemistry*, Third Edition, Thomson Learning Inc., ISBN 0-534-49033-6.
- Georgescu S.E., Manea M.A., Dinischiotu A., Tesio C.D., Costache M. (2007) Diagnostication of hyperkalemic periodic paralysis in horses. *Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies* 40(1):96-100.
- Georgescu S.E., Condac E., Dinischiotu A., Costache M. (2006) Molecular basis and diagnostication of SCID in Arabian horses. *Rom. Biotech. Let.* 11(5): 2875-2879.
- Georgescu S., Manea M., Dinischiotu A., Tesio C., Costache M. (2008) A method for Junctional Epidermolysis Bullosa Diagnostication in draft horses. *Biotechnol. Anim. Husb.* 24(1-2):127-132.
- Georgescu S.E., Manea M.A., Kevorkian S., Dinischiotu A., Costache M. (2009) A new PCR-RFLP method for analyzing the *Extension* locus involved in the coat colour of horses. *Lucrări științifice-Seria Medicină veterinară* 52(11):106-108.
- Georgescu S.E., Manea M.A., Kevorkian S., Costache M. (2010) A new method for analyzing the *Agouti* locus involved in the coat colour of horses. *Lucrări științifice-Seria Medicină veterinară* 53(12):246-248.
- Georgescu S.E., Costache M. (2010) *Lucrări practice-biochimia acizilor nucleici și biologie moleculară*, Editura Universității din București, București, România, ISBN 978-973-737-770-8.

- Georgescu S.E., Hrinică Gh., Rebedea M., Costache M. (2011a) Investigation of FecB mutation in four Romanian sheep breeds. *Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies* 44(1):219-222.
- Georgescu S.E., Hrinică Gh., Costache M. (2011b) Investigation of FecX¹ mutation in three Romanian sheep breeds. *Lucrări științifice-Seria Medicină veterinară* 54(13):220-223.
- Gerardi A.S. (1996) Bovine leukocyte adhesion deficiency: a brief overview of a modern disease and its implications. *Folia Vet.* 40: 65-69.
- Gerstein S.A. (2001) Molecular Biology Problem Solver: A Laboratory Guide. Ed. Wiley-Liss, Inc., New York, S.U.A., ISBN 0-471-22390-5.
- Goldmann W. (1993) PrP gene and its association with spongiform encephalopathies. *Brit. Med. Bull.*, 49:839-859.
- Goldmann W., Hunter N., Foster J.D., Salbaum J.M., Beyreuther K., Hope J. (1990) Two alleles of a neural protein gene linked to scrapie in sheep. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:2476-2480.
- Goldmann W., Martin T., Foster J. (1996) Novel polymorphisms in the caprine PrP gene: a codon 142 mutation associated with scrapie incubation period. *J. Gen. Virol.* 77:2885-2891.
- Goldmann W., O'Neill G., Cheung F., Charleson F., Ford P., Hunter N. (1999) PrP (prion) gene expression in sheep may be modulated by alternative polyadenylation of its messenger RNA *J. Gen. Virol.*, 80:2275-2283.
- Grande L., Bemis W.E. (1996) Interrelationships of Acipenseriformes, with comments on "Chondrostei", pp. 85-115. In Stiassny M.L., Parenti L.R., Johnson G.D., (Eds.), *Interrelationships of Fishes*, Academic Press, SUA.
- Greco N.J., Tor Y. (2007) Synthesis and site-specific incorporation of a simple fluorescent pyrimidine. *Nature Protocols* 2:305-316.
- Grunwald C., Stablie J., Waldman, J.R., Gross R., Wirgin I. (2002) Population genetics of shortnose sturgeon *Acipenser brevirostrum* based on mitochondrial DNA control region sequences. *Mol. Ecol.* 11:1885-1889.
- Guan F., Liu S., Shi G., Yang L. (2007) Polymorphism of *FecB* gene in nine sheep breeds or strains and its effects on litter size, lamb growth and development. *Anim. Reprod. Sci.* 99:44-52.
- Guindon S., Gascuel O. (2003) A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* 52(5):696-704.
- Haley C. (1999) Advances in quantitative trait locus mapping. In: Dekkers J.C.M., Lamont S.J., Rothschild M.F. (Eds.) *From Jay Lush to Genomics: Visions for Animal Breeding and Genetics*. Iowa State University, Ames, SUA.
- Hall T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41:95-98.
- Hanrahan J.P., Gregan S., Mulsant P., Mullen M., Davis G., Powell R., Galloway S. (2004) Mutations in the genes for oocyte derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep. *Biol. Reprod.* 70:900-909.
- Hrinică Gh., Georgescu S.E., Vicovan G., Nechifor I. (2014) Genetic and pathological aspects of Prion protein in sheep belonging to Botosani Karakul breed. *AgroLife Scientific Journal* 3(1):69-74.
- Hunter N., Foster J.D., Goldmann W., Stear M.J., Hope J., Bostock C. (1996) Natural scrapie in a closed flock of Cheviot sheep occurs only in specific PrP genotypes. *Arch. Virol.* 141:809-824.

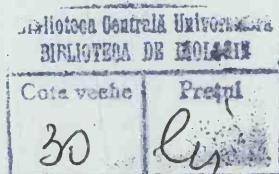
- Jennekens L., Meyer J.N., Hörstgen-Schwark G., May B. (2001). A fixed allele at microsatellite LS-39 is characteristic for the black caviar producer *Acipenser stellatus*. *J. Appl. Ichthyol.* 17:39-42.
- Johnson R.K., Nielsen M.K., Casey D.S. (1999) Responses in ovulation rate, embryonal survival, and litter traits in swine to 14 generations of selection to increase litter size. *J. Anim. Sci.* 77:541-557.
- Jones R.W. and Simmons M.D. (1996) A review of the stratigraphy of Eastern Paratethys (Oligocene-Holocene). *Bull. Br. Mus. Nat. Hist. Geol.* 52:25-49.
- Jorgensen C.B., Agerholm J.S., Pedersen J., Thomsen P.D. (1993) Bovine leukocyte adhesion deficiency in Danish Hosltein-Friesian Cattle. PCR screening and allele frequency Estimation. *Acta Vet. Scand.* 34:231-236.
- Kehrli M.E., D.E. Shuster, M.R. Ackermann (1992) Leukocyte adhesion deficiency among Holstein cattle. *Cornell. Vet.* 82:103-109.
- Kevorkian S., Manea M.A., Georgescu S.E., Dinischiotu A., Costache M. (2008a) Genotyping of β -lactoglobulin gene in Karakul sheep breed. *Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies* 41(1):112-116.
- Kevorkian S., Manea M.A., Georgescu S.E., Dinischiotu A., Costache M. (2008b) Genotyping of α S1-casein gene in Karakul sheep breed. *Lucrări științifice-Seria Medicină veterinară* 51(10):79-81.
- Kevorkian S.E.M., Zăuleț M., Manea M.A., Georgescu S.E., Costache M. (2011) Analysis of the ORF region of the prion protein gene in the Botosani Karakul sheep breed from Romania. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 35(2):105-109.
- Khodorevskaya R.P., Krasikov E.V., Dovgopol G.F., Zhuravleva O.L. (2000) Formation of the stock of Caspian Acipenserids under present-day conditions. *J. Ichthyol.* 40:602-609.
- Khodorevskaya R.P., Ruban G.I., Pavlov D.S. (2009) Behaviour, migrations, distribution and stocks of sturgeons in the Volga-Caspian basin; Books on Demand GmbH, Germany.
- Khoshkholgh M., Pourkazemi M., Nazari S., Azizzadeh-Pormehr L. (2011) Genetic diversity in the Persian sturgeon, *Acipenser persicus*, from the south Caspian Sea based on mitochondrial DNA sequences of the control region. *Caspian J. Env. Sci.* 9(1):17-25.
- Klukowska J., Urbaniak B., Switonski M. (1999) High frequency of M307A mutation at FUT1 locus, causing resistance to oedema disease, in an autochthonous polish pig breed, the Zlotnicka spotted. *J. Anim. Breed. Genet.* 116:519-524.
- Korlach J., Marks P., Cicero R., Gray J., Murphy D.L., Roitman D.B., Pham T.T., Otto G.A., Foquet M., Turner S.W. (2008) Selective aluminum passivation for targeted immobilization of single DNA polymerase molecules in zero-mode waveguide nanostructures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105:1176-1181.
- Krieger J., Hett A.K., Fuerst P.A. (2008) The Molecular Phylogeny of the Order Acipenseriformes Revisited. *J. Appl. Ichthyol.* 24 (Supplement 1):36-45.
- Kumar S., Kolte P., Mishra A., Arora A., Singh V. (2006) Identification of the *FecB* mutation in Garole x Malpura sheep and its effect on litter size. *Small Rum. Res.* 64:305-310.
- Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P. (2007) ClustalW and ClustalX version 2.0. *Bioinformatics* 23:2947-2948.
- Lehninger A.L., Nelson D.L., Cox M.M., Nelson D.L. (2004) Principles of Biochemistry, 4th Edition, W H Freeman & Co, ISBN 9780716743392.

- Leone P., Primiceri S., Fraghi A., Piredda G., Pilla F., Veltri C., Rasero R., Sacchi P. (1998) Polimorfismo dei loci $\alpha s1$ e β -lactoglobulina in ovini di razza Sarda e Delle Langhe (polymorphisms of $\alpha s1$ -casein and β -lactoglobulin in Sarda and Delle Langhe sheep). In: *Proc. IV Congresso Nazionale Biodiversita Germoplasma Locale e Sua Valorizzazione*, Alghero, Italy, pp. 8-11.
- Leveziel H., Metenier L., Guerin G., Cullen P., Provot C., Bertaud M., Mercier J.C. (1991) Restriction fragment length polymorphism of ovine casein genes: close linkage between the $\alpha s1$ - $\alpha s2$, β and κ -casein loci. *Anim. Genet.* 22:1-10.
- Lewin B. (2004) *Genes VIII*, Pearson Education, S.U.A.
- Librado P., Rozas J. (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25:1451-1452.
- Lodish H., Berk A., Zipursky S.L., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J. (2000) *Molecular Cell Biology*, 4th edition, Ed. W.H. Freeman and Company, SUA.
- Ludwig A., May B., Debus L., Jenneckens I. (2000) Heteroplasmy in the mtDNA control region of sturgeon (*Acipenser*, *Huso* and *Scaphirhynchus*). *Genetics* 156:1933-1947.
- Ludwig A., Congiu L., Pitra C., Fickel J. (2003) Nonconcordant evolutionary history of maternal and paternal lineages in Adriatic sturgeon. *Mol. Ecol.* 12: 3253- 3264.
- Manea M.A., Kevorkian S., Georgescu S.E., Dinischiotu A., Costache M. (2008a) The α -1 fucosyltransferase gene polymorphism in correlation with the susceptibility of swine to *Escherichia coli* infection. *Lucrări științifice-Seria Medicină veterinară* 51(10):93-95.
- Manea M.A., Kevorkian S., Georgescu S.E., Dinischiotu A., Costache M. (2008b) Diagnostication of Malignant hyperthermia in swine. *Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies* 41(1): 117 -121.
- Manea M.A., Georgescu S.E., Kevorkian S., Dinescu S., Costache M. (2010) Genotyping estrogen receptor polymorphism in pigs, using the PCR-RFLP method. *Lucrări științifice-Seria Medicină veterinară* 53(12):103-106.
- Marziali A.S., Ng-Kwai-Hang K.F. (1986) Effects of milk composition and genetic polymorphism on coagulation properties of milk. *J. Dairy Sci.* 69:1793-1798.
- McKernan K., Peckham H., Costa G., McLaughlin S., Fu Y., Tsung E., Clouser C., Duncan C., Ichikawa J., Lee C., Zhang Z., Ranade S., Dimalanta E., Hyland F., Sokolsky T., Zhang L., Sheridan A., Fu H., Hendrickson C., Li B., Kotler L., Stuart J., Malek J., Manning J., Antipova A., Perez D., Moore M., Hayashibara K., Lyons M., Beaudoin R., Coleman B., Laptewicz M., Sannicandro A., Rhodes M., Gottimukkala R., Yang S., Bafna V., Bashir A., MacBride A., Alkan C., Kidd J., Eichler E., Reese M., DeLa Vega F., Blanchard A. (2009) Sequence and structural variation in a human genome uncovered by short-read, massively parallel ligation sequencing using two-base encoding. *Genome Res.* 19(9):1527-1541.
- Meijerink E., Fries R., Vögeli P., Masabanda J., Wigger G., Stricker C., Neuenschwander S., Bertschinger H., Stranzinger G. (1997) Two α (1,2) fucosyltransferase genes on porcine chromosome 6q11 are closely linked to the blood group inhibitor (S) and *Escherichia coli* F18 receptor (ECF18R) loci. *Mamm. Genome* 8:736-741.
- Metzker M.L. (2010) Sequencing technologies - The Next Generation. *Nat. Rev.:Genet.* 11:31-46.

- Milenkovic D., Chaffaux S., Taourit S., Guérin G. (2003) A mutation in the *LAMC2* gene causes the Herlitz junctional epidermolysis bullosa (H-JEB) in two French draft horse breeds. *Genet. Sel. Evol.* 35:249-256.
- Moum T., Olsaker I., Hopp P., Moldal T., Valheim M., Benestad S.L. (2005) Polymorphisms at codons 141 and 154 in the ovine prion protein gene are associated with scrapie Nor98 cases. *J. Gen. Virol.* 86:231-235.
- Mulsant P., Lecerf F., Fabre S., Schibler L., Monget P., Lanneluc I., Pisselet C., Riquet J., Monniaux D., Callebaut I., Cribiu E., Thimonier J., Teyssier J., Bodin L., Cognie Y., Chitour N., Elsen J.M. (2001) Mutation in bone morphogenetic protein receptor-IB is associated with increased ovulation in Booroola ewes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:5104-5109.
- Nagahata H., Miura T., Tagaki K., Othake M., Noda H., Yasuda T., Nioka K. (1997) Prevalence and Allele Frequency Estimation of Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency (BLAD) in Holstein-Friesian Cattle in Japan. *J. Vet. Med.Sci.* 59:233-238.
- Ng-Kwai-Hang K.F., Hayes J.F., Moxley J., Monardes H.G. (1986) Relationships between milk protein polymorphisms and major milk constituents in Holstein-Friesian cows. *J. Dairy Sci.* 69:22-26.
- Ng-Kwai-Hang K.F., Monardes H., Hayes J. (1990) Association between genetic polymorphism of milk proteins and production traits during three lactations. *J. Dairy Sci.* 73:3414- 3420.
- Page R.D. (1996) TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12:357-358.
- Phillips R.B., Oakley T.H. (1997) Phylogenetic relationships among the *Salmonidae* based on nuclear DNA and mitochondrial DNA sequences. In: Kocher T, Stepien C. *Molecular Systematics of Fishes*. San Diego Academic Press, SUA., pp:145-162.
- Pietrola E., Carta A., Fraghì A., Piredda G., Pilla F. (2000) Effect of β -lactoglobulin locus on milk yield in Sarda ewes. *Zoot. Nutr. Anim.* 26:129-133.
- Pirogovskii M.I., Sokolov L.I., Vasil'ev V.P. (1989) *Huso huso* (Linnaeus, 1758). In: The freshwater fishes of Europe; Holcik J., Ed.; AULA-Verlag, Weisbaden, Germany, Vol. I, Part II, pp. 156-200.
- Posada D., Crandall K.A. (1998) Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14 (9):817-818.
- Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945-959.
- Rampilli M., Cecchi F., Giuliotti L., Cattaneo T.M. (1997) The influence of β -lactoglobulin genetic polymorphism on protein distribution and coagulation properties in milk of Massese breed ewes. *DF/FIL Publ.* 9702:311-315.
- Rippinger P., Bertschinger H.U., Imberechts H., Nagy B., Sorg I., Stamm M., Wild P., Wittig W. (1995) Comparison of recently described adhesive fimbriae of *Escherichia coli* isolated from postweaning diarrhea and from oedema disease: proposed designations F18ab and F18ac for the antigenic variants. *Vet. Microbiol.* 45:281-295.
- Rothschild M.F., Jacobson C., Vaske D., Tuggle C., Wang L., Short T.H., Eckardt G., Sasaki S., Vincent A., McLaren D., Southwood O., Van der Steen H., Mileham S., Plastow G. (1996) The estrogen receptor locus is associated with a major gene influencing litter size in pigs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:201-205.

- Rudolph J.A., Spier S.J., Byrns G., Rojas C.V., Bernoco D., Hoffman E.P. (1992) A sodium channel Phe to Leu mutation in periodic paralysis in Quarter Horses: a common defect disseminated by selective breeding of a popular sire. *Nat. Genet.* 2:144-147.
- Saccone C., Attimonelli M., Sbisà E. (1987) Structural elements highly preserved during the evolution of the D-loop containing region in vertebrate mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.* 26: 205-211.
- Sharp J.A. and Nicholas K. (2014) Molecular genetics of milk protein production. In: Garrik D.J. and Ruvinsky A. Ed., *The genetics of cattle*, CAB International, Boston, SUA.
- Shin E.K., Perryman L.E., Meek K. (1997) A kinase-negative mutation of DNA-PK(CS) in equine SCID results in defective coding and signal joint formation. *J. Immunol.* 158:3565-3569.
- Shiue Y., Bickel L., Caetano A., Millon L., Clark R., Eggleston M., Micheltmore R., Bailey E., Guerin G., Godard S., Mickelson J., Valberg S., Murray J., Bowling A.T. (1999) A synteny map of the horse genome comprised of 240 microsatellite and RAPD markers. *Anim. Genet.* 30:1-9.
- Short T.H., Rothschild M.F., McLaren D.G., Southwood O.I., Devries A.G., Van der Steen A., Tuggle C.K., Helm J., Vaske D.A., Mileham A.J., Plastow G.S. (1997) Effect of the estrogen receptor locus on reproduction and production traits in four commercial pig lines. *J. Anim. Sci.* 75:3138-3142.
- Sokolov L.I., Vasilev V.P. (1989) *Acipenser baeri* Brandt, 1869. pp. 263-284. In: Holcík J. (ed.) *The Freshwater Fishes of Europe, Volume 1, Part II, General Introduction to Fishes, Acipenseriformes*, AULA-Verlag, Wiesbaden, Germany.
- Sokolov L.I. and Tspekin E.A. (1996) *Acipenserids of the Azov-Black Sea and the Caspian basins (a historical review)*. *Vopr. Ikhtiol.* 36:15-27.
- Souza C.J., MacDougall C., Campbell B.K., McNeilly A.S., Baird D.T. (2001) The Booroola (*FecB*) phenotype is associated with a mutation in the bone morphogenetic receptor type 1B (*BMPR1B*) gene. *J. Endocrinol.* 169:1-6.
- Stryer A. (2003) *Biochemistry* 5th Edition, Ed. Freeman and Comapany, New York, SUA.
- Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24:1596-1599.
- Vasil'ev V.P. (2009) Mechanisms of Polyploid Evolution in Fish: Polyploidy in Sturgeons. In Carmona R., Domezain A., Gallego M.G., Hernando J.A., Rodríguez F., Ruiz-Rejón M. (Ed) *Biology, Conservation and Sustainable Development of Sturgeons. Fish and Fisheries Series*, 1st Edition, Netherlands: Springer, pp. 97-117.
- Vassu T., Stoica I., Csutak O., Mușat, F. (2001) *Genetica microorganismelor și inginerie genetică microbiană*, Editura Petron, București, România, ISBN 973-9470-24-6.
- Vătășescu-Balcan R., Georgescu S.E., Manea M.A., Rebedea M., Dinischiotu A., Costache M. (2006) Incidence of BLAD and DUMPS carriers in Romanian cattle breeds. *Rom. Biotech. Let.* 11(5): 2881-2884.
- Vătășescu-Balcan R.A., Georgescu S.E., Manea M.A., Dinischiotu A., Tesio C.D., Costache M. (2007) Identification of beta-lactoglobulin and kappa-casein genotypes in cattle. *Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies* 40 (1):211-216.
- Vătășescu-Balcan R.A., Georgescu S.E., Manea M.A., Dinischiotu A., Tesio C.D., Costache M. (2008) Romanian Dairy Cattle Genotypes, *Lucrări științifice-Seria Medicină veterinară* 51(10):1007-1009.

- Vennemann M., Koppelkamm A. (2010) mRNA profiling in forensic genetics I: Possibilities and limitations. *Forensic Sci. Int.* 203:71-75.
- Vida-Simiti I. (2006) Procedee fizico-mecanice de separare a poluanților, Editura UTPRES, Cluj-Napoca, România, ISBN 973-686-438-3.
- Virkler K., Lednev I.K. (2009) Analysis of body fluids for forensic purposes: From laboratory testing to nondestructive rapid confirmatory identification at a crime scene. *Forensic Sci. Int.* 188:1-17.
- Vlasenko A.D., Pavlov A.V., Vasil'ev V.P. (1989) *Acipenser gueldenstaedtii* (Brandt, 1833). In: The freshwater fishes of Europe; Holcik J., Ed.; AULA-Verlag, Germany, Vol. I, Part II, pp. 294-344.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23(21):4407-4414.
- Walsh P.D. (2000) Sample size for diagnosis of conservation units. *Conserv. Biol.* 14:1533-1537.
- Wang Y., Qin Z., Qiao J., Zhao D. (2008) Polymorphisms of the prion protein gene in sheep of Inner Mongolia. *Virus Genes* 37:128-130.
- Watson J.D., Baker T.A., Bell S.P., Gann A., Levine M., Losick R. (2004) Molecular Biology of the Gene, 5th Ed., Pearson Education, SUA.
- Weir B. and Cockerham C. (1984) Estimating F statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38(6):1358-1370.
- Wilson M.E., Sonstegard T.S., Smith T.P., Fahrenkrug S.C., Ford S.P. (2000) Differential gene expression during elongation in the preimplantation pig embryo. *Genesis* 26:9-14.
- Wirgin I., Grunwald C., Carlson E., Stabile J., Peterson D., Waldman J. (2005) Range-wide population structure of shortnose sturgeon *Acipenser brevirostrum* based on sequence analysis of mitochondrial DNA control region. *Estuaries* 28:406-421.
- Zhang L., Li N., Fan B., Fang M., Xu W. (2004) PRNP polymorphisms in Chinese ovine, caprine and bovine breeds. *Anim. Genet.* 35:457-461.
- Zubakov V.A. (1988) Climatostratigraphic scheme of the Black Sea Pleistocene and its correlation with the oxygen-isotope scale and glacial events. *Quat. Res.* 29:1-24.



Tiparul s-a executat sub c-da nr. 3910/2016,
la Tipografia Editurii Universității din București

Biologia moleculară este ramura biologiei care se ocupă cu studierea mecanismelor biologice la nivel molecular. Aceasta permite, alături de alte discipline biomedicale, înțelegerea fenomenelor celulare și caracterizarea, din acest punct de vedere, atât a proceselor fiziologice, cât și a celor patologice.

Caracterul aplicativ al biologiei moleculare este condiționat de evoluția metodologiei experimentale care reprezintă un instrument necesar și complementar pentru abordarea, investigarea și interpretarea la nivel molecular a proceselor specifice organismelor vii.

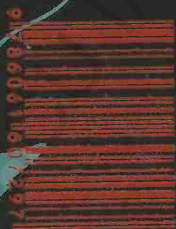
Dezvoltarea în ultimii ani a unui număr impresionant de metode de laborator destinate studiilor moleculare obligă pe cei interesați de aceste probleme să utilizeze tehnici a căror valoare de predicție a fost confirmată.

În volumul de față sunt prezentate:

- metode de izolare și analiză a acizilor nucleici;
- metode de clonare moleculară;
- tehnici de hibridizare moleculară;
- tehnici de amplificare *in vitro* a secvențelor de acizi nucleici;
- metode de secvențializare a acizilor nucleici;
- aplicații practice ale tehnicilor de biologie moleculară.

Considerăm că informațiile prezentate vor fi extrem de utile specialiștilor din domeniul biochimiei, geneticii și biologiei moleculare.

30



9 780660 100000

Editura
Universității
din București



TM